



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ISOLADOS DE PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL PORTUGUESA

ANDREIA ALEXANDRA MESQUITA CHAVES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

VOGAIS

Doutora Teresa de Jesus da Silva Matos

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2013

LISBOA



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ISOLADOS DE PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL PORTUGUESA

ANDREIA ALEXANDRA MESQUITA CHAVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA / PRODUÇÃO ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor Fernando Manuel d'Almeida Bernardo

VOGAIS

Doutora Teresa de Jesus da Silva Matos

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2013

LISBOA

Dedicatória

À minha incansável mãe, ao meu pai, ao meu maninho e a todos os que ao longo deste percurso me acompanharam e apoiaram.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite nele.”
Roberto Shinyashiki

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza, por me ter guiado neste caminho de uma forma que só ela soube.

À minha mãe por tudo o que me permitiu alcançar, por todo o apoio e horas de dedicação e principalmente por me lembrar sempre do quanto importante é batalharmos pelo que queremos alcançar.

Ao meu pai e ao meu mano, por todo o amor, paciência e dedicação à minha felicidade e ao meu sucesso.

À minha avó Vitória por ter sempre uma palavra de conforto nas horas de maior inquietação.

Ao Ricardo pelo carinho e paciência que teve.

À minha tia Lena e ao meu tio Manuel pela constante preocupação.

À minha avó Mariana, aos meus padrinhos e primos por sempre acreditarem em mim.

À Mónica por ter sido sempre a minha irmã de coração e por estar sempre a meu lado.

Às minhas amigas, Cátia, Sara, Elisabete e Patrícia por todos os conselhos, apoio e momentos de descontração imprescindíveis para ultrapassar este patamar.

A todas as pessoas do laboratório do Departamento de Produção Animal e de Segurança Alimentar da FMV, nomeadamente, Ana Martins, Lena, Zé, Jú, Cynthia e Eunice por todo o carinho, apoio, paciência e ajuda.

Ao Professor Doutor Rui Bessa pelo apoio prestado.

À Professora Doutora Teresa de Jesus Silva Matos por me ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Constança Pomba pela cedência de estirpes de *Staphylococcus* de referência.

Um Muito Obrigada a todas estas pessoas pois, sem elas teria sido impossível alcançar e realizar este trabalho.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

Este trabalho foi subsidiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto “Portuguese traditional meat products: strategies to improve safety and quality” (PTDC/AGR-ALI/119075/2010).

AValiação DA SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ISOLADOS DE PRODUTOS DE SALSICHARIA TRADICIONAL PORTUGUESA

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade a antibióticos e determinar a existência de genes de resistência à Tetraciclina potencialmente associados a plasmídeos, em isolados de *Lactobacillus plantarum*. A partir de uma coleção de 84 isolados de diferentes produtos cárneos fermentados e superfícies de trabalho, em 5 indústrias da região do Alentejo, foi realizada a identificação ao género por PCR e identificação dos tipos por PCR *Fingerprinting*, sendo agrupados 79 isolados da espécie *L. plantarum*.

A avaliação da suscetibilidade dos isolados a antibióticos foi efetuada através do teste por difusão de discos para 9 antibióticos: Vancomicina, Penicilina G, Eritromicina, Tetraciclina, Gentamicina, Daltopristina/Quimospristina, Rifampicina, Lincomicina e Cloranfenicol. A coleção de isolados demonstrou ter maiores resistências para a Penicilina (88,6%) e para a Vancomicina (86%) apresentando elevada suscetibilidade para o Cloranfenicol (100%) e para a Eritromicina (98,7%).

A deteção do gene *tet*(RPP) teve uma baixa incidência (2,53%) na coleção de isolados e a deteção de genes que conferem resistência à tetraciclina teve uma ocorrência de 2,53%, 45,57% e 2,53%, para a *tet*(M), *tet*(K) e *tet*(L), respetivamente.

Dos resultados genéticos e fenotípicos obtidos, as estirpes Cv2C6 e S4M7 destacaram-se positivamente uma vez que não expressaram resistências nem apresentaram os genes de resistência *tet* em estudo. Assim, poderão ser indicadas como potenciais estirpes a serem utilizadas como culturas *starter* após a realização de mais alguns estudos detalhados.

Palavras-chave: resistência, tetraciclina, *Lactobacillus plantarum*, genes de resistência, *tet*'s, produtos cárneos fermentados, culturas *starter*.

EVALUATION OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ISOLATED FROM TRADICIONAL PORTUGUESE SAUSAGE PRODUCTS

Abstract:

The aim of this work was to evaluate the antibiotic susceptibility and determine the existence of Tetracycline resistance genes potentially associated to plasmids in *Lactobacillus plantarum*'s isolates. From a collection of 84 isolates from different fermented meat products and work surfaces, in 5 industries from Alentejo region, was performed the genus identification by PCR and the types' identification by PCR *Fingerprinting*, being grouped 79 isolates of the *L. plantarum* species.

The evaluation of isolates' susceptibility to antibiotics was performed by disc diffusion test to 9 antibiotics: Vancomycin, Penicillin G, Erythromycin, Tetracycline, Gentamicin, Dalfopristin/Quinupristin, Rifampicin, Lincomycin and Chloramphenicol. The collection of isolates has shown to have greater resistances to Penicillin (88.6%) and to Vancomycin (86%) showing high susceptibility to Chloramphenicol (100%) and to Erythromycin (98.7%).

The *tet* gene (RPP) detection had a low incidence (2.53%) in the isolates' collection and the genes detection which confer tetracycline resistance had an occurrence of 2.53%, 45.57% and 2.53% for *tet*(M), *tet*(K) and *tet*(L), respectively.

From genetic and phenotypic results obtained, the Cv2C6 and S4M7 strains stood out positively once no resistance was expressed neither presented the *tet* existence genes under study. So, may be indicated as potential strains to be used as starter cultures after conducting more detailed studies.

Keywords: resistance, tetracycline, *Lactobacillus plantarum*, resistance genes, *tet*'s, fermented meat products, starter cultures

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
Lista de Siglas e Símbolos	xii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Produtos cárneos fermentados - enchidos	3
2.2. A fermentação nos produtos cárneos fermentados.....	4
2.2.1. Microbiologia dos produtos cárneo fermentados.....	5
2.2.2. Culturas <i>starter</i>	6
2.3. Bactérias ácido lácticas (BAL) - caracterização	8
2.3.1. Género <i>Lactobacillus</i>	9
2.3.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> – caracterização e importância	10
2.4. Resistência a antibióticos – nova preocupação	11
2.4.1. Modos de transmissão de resistência a antibióticos.....	13
2.5. Resistência a antibióticos em <i>Lactobacillus</i>	15
2.5.1. Tetraciclina	17
2.5.1.1. Mecanismos de resistência à tetraciclina e base genética envolvida.....	18
3. Avaliação da Suscetibilidade a Antibióticos de <i>Lactobacillus plantarum</i> Isolados de Produtos de Salsicharia Tradicional Portuguesa	21
3.1 Objetivos e justificação	21
3.2. Materiais e Métodos	21
3.2.1. Coleção de isolados	21
3.2.2. Identificação e caracterização genotípica dos isolados de <i>Lactobacillus</i>	22
3.2.2.1. Extração de ADN cromossomal	22
3.2.2.1.1. Cultivo dos isolados para o processo de extração.....	22
3.2.2.1.2. Processo de extração	22
3.2.2.1.3. Estirpes de controlo.....	23
3.2.2.2. Metodologias de PCR.....	23
3.2.2.2.1. PCR para identificação do género <i>Lactobacillus</i>	23
3.2.2.2.2. PCR <i>Fingerprinting</i>	24
3.2.3. Caracterização da sensibilidade dos isolados a antibióticos.....	25
3.2.3.1. Teste de sensibilidade a antibióticos	25
3.2.3.2. Estirpes de controlo	26
3.2.4. Caracterização genética da resistência dos isolados à tetraciclina	26
3.2.4.1. PCR de deteção da presença do gene associado à produção de proteína de proteção ribossomal (RPP).....	26
3.2.4.2. PCR de deteção de presença dos genes de resistência <i>tet</i> 's (M), (L) e (K)	27
3.2.5. Análise estatística	28
4. Resultados.....	30
4.1. Identificação e caracterização genotípica dos isolados de <i>Lactobacillus</i>	30
4.1.1. PCR para identificação do género <i>Lactobacilli</i>	30
4.1.2. PCR <i>Fingerprinting</i>	30
4.2. Caracterização da sensibilidade a antibióticos.....	33
4.2.1. Teste de sensibilidade a antibióticos.....	33
4.3. Caracterização genética da resistência dos isolados à tetraciclina.....	36

4.3.1. PCR de detecção do gene associado a proteínas de proteção ribossomal inespecíficas..	36
4.3.2. PCR de detecção dos genes de resistência <i>tet's</i> (M), (L) e (K)	36
4.3.3. Suscetibilidade fenotípica à tetraciclina e presença de genes de resistência <i>tets</i> RPP, M, L e K.....	37
4.4. Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de <i>Lactobacillus plantarum</i> e a sua relação com a resistência à Tetraciclina	40
4.4.1. Similaridade entre estirpes fenotipicamente resistentes à Tetraciclina	42
5. Discussão	43
6. Conclusão	50
7. Bibliografia.....	51

Figura 1: Diferentes mecanismos de resistência à Tetraciclina.....	19
Figura 2: Halos de inibição formados pela presença dos discos de antibióticos	25
Figura 3: Exemplo de uma imagem de electroforese dos produtos amplificados no PCR para identificação do género <i>Lactobacillus</i>	30
Figura 4: Exemplo de uma imagem de electroforese dos produtos amplificados no PCR <i>Fingerprinting</i> de isolados <i>Lactobacillus</i>	31
Figura 5: Dendrograma da análise do perfil genético das estirpes <i>L. plantarum</i> com identificação de grupos apresentando uma semelhança superior a 75%	32
Figura 6: Percentagem de Isolados com Resistência, Resistência Intermédia e Suscetibilidade a cada um dos antibióticos testados	34
Figura 7: Dendrograma da análise do perfil genético conjugado com a análise fenotípica das estirpes <i>L. plantarum</i>	41
Figura 8 - Dendrograma da análise do perfil genético em conjunto com a análise fenotípica das estirpes <i>L. plantarum</i> que demonstraram resistência à tetraciclina.....	42

Tabela 1: Microrganismos utilizados como culturas <i>starter</i> na fermentação cárnea	7
Tabela 2: Descrição da origem fabril e de recolha de cada um dos isolados em estudo	22
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados na reação PCR para identificação de género <i>Lactobacillus</i>	23
Tabela 4: <i>Primer</i> utilizado na reação PCR <i>Fingerprinting</i>	24
Tabela 5: <i>Cutoff Points</i> dos Antibióticos testados	26
Tabela 6: <i>Primers</i> utilizados na reação PCR de detecção da presença do gene RPP.....	26
Tabela 7: <i>Primers</i> utilizados no multiplex de detecção de presença das <i>tet</i> 's (M), (L) e (K)	27
Tabela 8: Percentagem de isolados de <i>Lactobacillus</i> agrupados pela origem fabril apresentando suscetibilidade aos antibióticos em estudo	35
Tabela 9: Isolados que apresentaram a presença do gene alvo RPP	36
Tabela 10: Lista de estirpes <i>Lactobacillus</i> onde foram detetados os genes de resistência à tetraciclina	37
Tabela 11: Tabela resumo dos resultados relacionados com a expressão fenotípica da suscetibilidade à tetraciclina, detecção de genes de resistência <i>tets</i> RPP, M, K e L.....	38

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
ATTC - *American Type Culture Collection*
BAL – Bactérias ácido lácticas
BHI – *Brain- Hart- Infusion*
C – Chouriço de carne
CA-SFM – *Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*
CECT – Coleção espanhola de cultivos tipo
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
Cv – Chouriço de vinho
dNTP’s - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DSM - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*
EUA – Estados Unidos da América
FDA – *Food and Drug Administration*
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
GRAS - *Generally Regarded as Safe*
GTG - Guanina, timina e guanina
HR – Humidade relativa
L - Linguiça
MRS - *Man- Rogosa- Sharpe*
NP – Normal Portuguesa
OPC - *Oligonucleotide purification cartridge*
P - Paio
P0 - Chouriço
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
RPP – Proteína de proteção ribossomal
S – Salsichão
SG – Salsichão grosso
Tc^r – Resistência á Tetraciclina
TE - Tampão
tet – Gene de resistência á tetraciclina
t-RNA - Ácido ribonucleico transportador
TSA – Teste de sensibilidade a antibióticos
UPGMA – *Unweighted Pair Groups using Arithmetic averages*
USA – *United States of America*
VWR – Companhia Georges Van Waters e Nat Stuart Rogers

Lista de Siglas e Símbolos

a_w – Atividade da água

bp – Pares de Bases

C+ - Controlo positivo

CO₂ – Dióxido de carbono

I – Suscetibilidade intermédia

kDa – kiloDalton

M – Molar

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

ml - Mililitro

mm – Milímetros

mM – Milimolar

rpm – Rotações por minuto

R - Resistentes

S – Sensíveis

U - Unidades

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µM – Micromolar

V - Volts

1. Introdução

Os produtos cárneos fermentados surgem na história da alimentação com o objectivo de conservar a carne, durante longos períodos de tempo, de forma a permitir a sobrevivência das populações durante períodos de escassez.

A origem destes produtos ocorreu quando os nossos antepassados compreenderam que a interação entre algo desconhecido que existia no ambiente (mais tarde classificados como microrganismos) e os ingredientes misturados na carne gerava características qualitativas finais de grande interesse organolético aumentando a sua capacidade de conservação. Deste modo estes produtos cárneos fermentados ganharam dimensão e apesar de variações as características base permanecem geralmente as mesmas. Estas características tais como *flavor*, textura, palatibilidade, cor, entre outras, são responsáveis pela grande valorização que os consumidores dão a este tipo de produtos.

Com o desenvolvimento, o fabrico de produtos cárneos fermentados foi estudado e totalmente compreendido, sendo explicada a microbiologia da fermentação e afinado o processo de fabrico. Deste modo e como resposta ao aumento da procura e consumo, a indústria adaptou os métodos tradicionais à escala industrial com a produção de uma maior quantidade de produto. Esta nova necessidade deve acompanhar outra, a de produzir um produto de forma segura garantindo que a sua ingestão não causa doença ao consumidor. Assim, é fundamental que haja controlo do processo de fabrico e da fermentação utilizando microrganismos específicos nomeadamente as culturas *starter*, responsáveis pela melhoria do processamento dos produtos cárneos, adquirindo os produtos finais características únicas para o consumidor.

A escolha e seleção destes microrganismos é efetuada de uma forma muito cuidada para que nenhum deles gere resultados não desejados no produto final. Uma das preocupações atualmente referida está relacionada com a existência de mecanismos de transmissão de resistência a antibióticos que possam passar da microbiota *starter* para a patogénica levando a posteriores dificuldades terapêuticas no tratamento de doenças em humanos (Ammor *et al.*, 2007)

Este trabalho teve como objectivos: i) caracterizar o perfil de resistências a antibióticos de *Lactobacillus plantarum* isolados de enchidos fermentados, secos e fumados; ii) caracterizar genotipicamente estes isolados; iii) compreender qual o tipo de resistência das estirpes e iv) definir qual, ou quais as estirpes com maior apetência para serem utilizadas como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados.

A estrutura deste trabalho é dividida em: Revisão Bibliográfica, onde se enquadra a principal informação disponível sobre o tema estudado; Materiais e Métodos, onde são explicadas todas as metodologias que permitiram cumprir os objetivos propostos; apresentação dos Resultados

obtidos com discussão dos mesmos, tendo como base outros trabalhos realizados dentro da temática estudada, as Conclusões obtidas com o trabalho desenvolvido e por fim a Bibliografia.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Produtos cárneos fermentados – enchidos

O consumo de carne faz parte do quotidiano do Homem há milhares de anos e durante séculos a principal preocupação da humanidade era a de obter alimentos, nomeadamente a carne, e conservá-los durante um período o mais longo possível. Os produtos cárneos fermentados surgiram principalmente devido a esta necessidade de conservação da carne, órgãos e sangue resultantes da matança de um animal, permitindo ao Homem ter uma grande variedade de alimento em boas condições durante um longo período de tempo (Carvalho, 2010).

Com o decorrer dos séculos observou-se uma gradual utilização de métodos que permitiram aumentar a durabilidade da carne de animais caçados e criados, sendo que, para isso, foram necessários processos como a cozedura, a salga, a secagem, o congelamento, a fumagem e a fermentação. Estes procedimentos foram surgindo e ganhando dimensão nos costumes tradicionais de várias culturas, envolvendo em alguns casos microrganismos, que além de aumentarem o tempo de prateleira de um alimento permitem melhorar também a textura e o *flavor* do produto final (Chisti, 1999; Arnau, Serra, Comaposada, Gou & Garriga, 2007). Gradualmente por todo o mundo foram surgindo produtos cárneos típicos, utilizando métodos de fabricos diferentes e ingredientes específicos (Silva, 2003).

Em Portugal a tradição do produto cárneo fermentado está muito presente nas raízes gastronómicas por todas as regiões do país. A presença, em todas as casas agrícolas, das pocilgas para criar os porcos para a matança está bem presente nas memórias dos nossos pais e avós, tal como a festa e a reunião familiar associada a esta tradicional comemoração (Cerqueira, 2000). Nos dias de hoje este costume não é tão comum como outrora, mas a produção e apreciação dos produtos permaneceram na população, porém foram feitas alterações nos métodos de fabrico passando-os a mais industrializados e em maior escala.

Atualmente, as regiões onde existe maior fabrico deste tipo de produtos são, no Norte de Portugal (nomeadamente Trás-os-Montes), no Ribatejo e no Alentejo apesar de também existir algum fabrico na região de Monchique (Fraqueza, 2003).

Existem vários tipos de produtos cárneos fermentados em Portugal, sendo dos mais conhecidos e apreciados os denominados por enchidos, isto é, chouriços de carne, vinho e sangue, salpicões, morcelas, farinheiras, linguças, paios, entre muitos outros. De acordo com as Normas Portuguesas, NP 588:2008 um enchido é por definição “um produto curado cuja característica principal é a de estar contido em tripa comestível, natural ou não” e, quando fumado “enchido curado em que a fumagem é o processo predominante, de tal forma que esta confere ao produto a cor e o *flavor* característicos”. De acordo com Lücke (1998), um enchido fermentado é preparado a partir de carne temperada, colocada depois em invólucros próprios,

deixada a fermentar e a maturar durante um determinado período de tempo. Além do processo de maturação, muitos dos produtos cárneos fermentados são sujeitos também a um processo de secagem ou fumagem de forma a aumentar a sua conservação, gerando assim uma associação do enchido a um produto cárneo fermentado e fumado/seco (Roça, 2009).

Estes produtos são caracterizados pelas qualidades sensoriais que possuem, devido ao processo fermentativo presente na sua produção.

A massa inicial de um produto cárneo fermentado contém uma enorme variedade de constituintes, como carne, gordura, ervas e especiarias, vinhos, aguardente, sal, sais de cura, acidificantes, entre outros (Carvalho, 2010). Estes ingredientes são a base para a ação fermentativa desempenhada principalmente pelas bactérias existentes na massa.

2.2. A Fermentação nos produtos cárneos fermentados

A fermentação cárnea é um processo dinâmico, caracterizado por contínuas alterações bioquímicas, biofísicas e microbiológicas que permitem conferir características de durabilidade e palatabilidade únicas aos produtos cárneos fermentados. Deste modo este processo desempenhou um papel fundamental na sobrevivência de populações durante momentos em que a escassez de comida punha em risco a sobrevivência das mesmas (Wigley, 1999; Pinto, Posano & Heinemann, 2001).

Este processamento alimentar, teve origem há milhares de anos e ocorreu devido à adição accidental de microrganismos nos alimentos locais o que gerou alterações nos produtos tornando-os mais resistentes à deterioração e melhorando as suas características sensitivas, como o sabor, cheiro, aspeto, textura ou *flavor*. A utilização deste processo tornou-se tradicional e habitual nos costumes regionais em vários pontos do mundo e dependendo da região geográfica, o produto ganha textura e sabores específicos consoante os ingredientes autóctones dessas regiões e as populações microbianas existentes, gerando muitas das vezes a denominação de um dado produto pelo nome do local de onde é originário (Price & Schweigert, 1994; Campbell-Platt, 1999; Velho, Fonseca & Pinheiro, 2013).

Atualmente a fermentação em produtos cárneos é um processo bastante desenvolvido não sendo apenas uma forma de conservação mas também uma forma de melhorar um produto a nível nutricional e funcional, além de o tornar mais seguro. Os avanços tecnológicos e científicos permitiram um maior e mais aprofundado conhecimento dos microrganismos, metabolismos e enzimas envolvidas neste processo e como tal um maior controlo e precisão foi alcançado. Deste modo interligando o que melhor existe entre os métodos tradicionais de fermentação e os novos conhecimentos, atingiu-se o ponto industrial atual em que este

processo primordial representa uma enorme importância em muitos dos produtos consumidos e preferidos pela população de todas as faixas etárias.

Durante a fermentação ocorrem várias transformações nos ingredientes iniciais dos produtos cárneos. Estas decorrem continuamente durante dois momentos do processo de fabrico: i) durante o período de repouso antes do enchimento da massa, e ii) durante a fase de fumagem e/ou secagem (Elias, Fraqueza & Barreto, 2005).

O período de repouso corresponde à maturação da massa, durante a qual começam a ocorrer diversas modificações. As principais transformações verificadas nesta fase ocorrem devido à solubilização das proteínas das fibras musculares por ação do sal e pelo início do desenvolvimento da microbiota halotolerante fermentativa, como por exemplo, as bactérias ácido lácticas (BAL) e *Staphylococcus*. As BAL atuam sobre os açúcares da carne através da fermentação láctica (Sousa & Ribeiro, 1983; Bedia *et al.*, 2011). Neste período a humidade relativa encontra-se entre os 70 e 80% e as temperaturas estão abaixo dos 10 °C impedindo o crescimento de agentes patogénicos como *Staphylococcus aureus*. Estas condições beneficiam a microbiota fermentativa sendo favorável para a qualidade do produto final (Sousa & Ribeiro, 1983; Prand, Fischer, Schmidhfer & Sinell, 1994).

O processo de fumagem é caracterizado pela exposição dos produtos cárneos à ação de fumo resultante de uma combustão de madeiras duras, em locais apropriados para o efeito como câmaras, estufas ou fumeiros. Esta etapa ocorre numa temperatura e num período variáveis consoante o produto fabricado, a dimensão do mesmo e a intensidade do fumo. A fumagem é classificada de acordo com as temperaturas ambientais que são atingidas: a frio ou a quente. A fumagem a frio ocorre a uma temperatura não superior a 30 °C ao nível dos produtos. Já a fumagem a quente ocorre a temperaturas na ordem dos 70-90 °C (Fraqueza, 2003; Sousa & Ribeiro, 1983).

Para enchidos tradicionais, como por exemplo o chouriço tradicional português, esta fumagem ocorre durante 1-3 dias, com uma intensidade baixa e temperaturas rondando os 25 °C (Almeida, 2009; Sousa & Ribeiro, 1983).

Após o período de fumagem, os produtos continuam a sofrer secagem em câmaras de estabilização com ambiente controlado ou no próprio fumeiro, levando a uma perda de água por evaporação e consequentemente a uma redução da atividade da água (a_w) (Patarata, Cardoso, Bessa, Silva & Martins, 1998; Andrés, Barat, Grau & Fito, 2007).

Deste modo durante a fumagem, o produto continua a sofrer a ação dos microrganismos presentes, com promoção da multiplicação da microbiota láctica presente na mistura cárnea, que continua a atuar durante a secagem. Durante estes processos o pH dos produtos diminui geralmente de 5,7 para 5,0 (Petaja-Kanninen & Puolanne, 2007). Em conjunto a redução da

a_w e a diminuição do pH impedem uma parte do desenvolvimento microbiano, o que contribui para a segurança e a durabilidade dos produtos finais (Fraqueza & Patarata, 2006; Ockerman & Basu, 2007). Por outro lado a diminuição do pH contribui diretamente para o sabor levemente picante e para a textura típica dos enchidos (Garcia, Gagleazzi & Sobral, 2000).

2.2.1. Microbiologia dos produtos cárneos fermentados

No processo de fabrico de produtos cárneos fermentados existem duas etapas de elevada importância, a maturação e a fumagem e/ou secagem. É durante estas fases, principalmente durante a Fumagem, que ocorre a fermentação (Elias, Fraqueza & Barreto, 2005). Esta gera diversas modificações químicas, físicas e sensoriais que originam as características típicas destes produtos, como a textura, o aroma ou o *flavor*. Estas modificações são causadas pela gradual atividade de diferentes grupos de microrganismos existentes na mistura da carne que desencadeiam um variado número de reações como a desidratação, a fermentação e acidificação dos hidratos de carbono, ao desenvolvimento da coloração típica destes produtos, a lipólise e a proteólise (Essid, Medini & Hassouma, 2008). Dos microrganismos presentes nos produtos cárneos fermentados, são as Bactérias Ácido Láticas que apresentam maior incidência, importância e destaque, sendo elas as responsáveis por muitas das qualidades típicas destes produtos. Estas reduzem o pH do produto rapidamente, tornando logo nos primeiros dias de fermentação, o meio seguro e protegido de bactérias responsáveis pela degradação do produto, além de conferirem a textura e a coloração característica (Lücke, 2000; Erkkilä *et al.*, 2001). O aroma típico dos enchidos fermentados é também resultado da ação destes microrganismos sobre as matérias-primas, da ação das enzimas da própria carne sobre os hidratos de carbono, as proteínas e os lípidos e dos condimentos e especiarias adicionados, criando características sensoriais peculiares do produto (Erkkilä *et al.*, 2001). Já o *flavor* resulta da soma dos compostos voláteis e não voláteis provenientes da degradação microbiana e das reações químicas que ocorrem no produto (Macedo, 2005).

Inicialmente a mistura de carne crua e ingredientes está, naturalmente, contaminada com uma grande variedade de microrganismos. Esta complexa microbiota deriva de vários fatores, nomeadamente, da própria carne, das tripas naturais, do ambiente fabril e dos operários. Nesta podem estar incluídos: *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. curvatus*, etc.), *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brochotrix*, *Listeria*, *Enterobacteriaceae* e bolores (Montel, 1999; Ordoñez & de la Hoz, 2007; Mejia & Molina, 2008). Além da microbiota dita natural, surgiu também a utilização de culturas de arranque selecionadas – Culturas *starter* – de forma a garantir a segurança e standadização das propriedades do produto final (volume, pH, cor) (Essid, *et. al.*, 2008).

2.2.2. Culturas *starter*

Primordialmente a fermentação dos produtos cárneos era feita na totalidade pela microbiota originária dos ingredientes e do meio de fabrico, mas os produtos resultantes não apresentavam uniformidade, o que não era o ideal para a comercialização destes. Mas os produtores perceberam que ao adicionar um pouco de carne já fermentada à mistura inicial permitia melhorar e acelerar o processo fermentativo, só que não existia um controlo dos níveis de inclusão de microrganismos. Deste modo iniciou-se uma técnica de cultivo prévio dos microrganismos para adiciona-los diretamente à mistura nas quantidades corretas, dando origem às chamadas culturas *starter* (Pinto, Ponsano & Heinemann, 2001).

As culturas *starter* surgiram na segunda metade do século 20, com o cultivo e seleção de determinadas bactérias utilizadas como promotoras de fermentação em produtos alimentares (Carvalho, 2010). Estas podem ser definidas como preparados compostos por uma ou mais estirpes de uma ou mais espécies de microrganismos (Tabela 1), ativos ou latentes, selecionados de forma a garantir, por um lado o fabrico de um produto seguro e com qualidade e por outro a capacidade de atingir determinados fins, como a melhoria da salubridade, da cor, da textura, do sabor e do valor nutritivo do produto (Wigley, 1999; Elias *et al.*, 2005). Além disso as culturas apropriadas para esta função devem ser aquelas que no passado foram isoladas da microbiota autóctone deste tipo de produtos tradicionais, que cresçam bem nas condições químicas e físicas encontradas nestes produtos cárneos, que sejam inofensivas para o homem e para a sua saúde, que não sejam patogénicas e não produzam toxinas e aminas biogénicas (Montel, 1999; Campagnol, Fries, Terra, Santos & Furtado, 2007).

A utilização de culturas *starter* é atualmente uma prática usual na produção industrial de produtos cárneos fermentados, e isto deve-se principalmente às vantagens associadas a esta utilização: i) Maior segurança do produto final, ii) Maior uniformidade do produto final, iii) Redução do período de secagem do produto, iv) Aumento da eficiência produtiva da indústria, v) Melhor consistência final do produto e vi) Maior durabilidade e tempo de vida do produto final (Wigley, 1999).

Tabela 1 – Microrganismos utilizados como culturas *starter* na fermentação cárnea (Terra & Brum, 1998).

Grupo de Microrganismos	Gênero	Espécie
Bactérias Ácido Lácticas	<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. sakei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. pentosus</i>
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>M. varians</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. carnosus</i> <i>S. xylosus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>S. griseus</i>
Leveduras	<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii</i>
	<i>Cândida</i>	<i>C. famata</i>
Bolores	<i>Penicilium</i>	<i>P. nalgiovense</i>
		<i>P. crysogenum</i>

As vantagens descritas apenas são possíveis pelo tipo de microrganismos selecionados, e estes resumem-se a duas grandes famílias fundamentais: as *Micrococcaceae* e a das Bactérias Ácido Lácticas (BAL) (Elias *et al.*, 2005), sendo a última a de maior relevância e a que maior utilização tem na indústria de produtos cárneos fermentados. Isto ocorre porque as BAL encaixam quase na perfeição e cumprem todos os requisitos necessários, em cima descritos, a uma boa cultura *starter*. As espécies de BAL geralmente mais utilizadas como culturas *starter* são *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. alimentarius*, *L. casei*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Staphylococcus xylosus* entre outras (Vasilopoulos *et al.*, 2008; Velho *et al.* 2013).

2.3. Bactérias ácido lácticas (BAL) - caracterização

Tal como referido, as Bactérias Ácido Lácticas são microrganismos de grande importância na indústria alimentar desempenhando um papel fundamental em produtos cárneos fermentados (Haully, Nogueira & Oliveira, 2001). Estas, apesar da grande variedade de microrganismos presentes na massa inicial de carne e no processo fermentativo destes produtos, são geralmente a microbiota dominante após o período de fermentação. Este domínio sobre a flora competitiva presente na massa inicial é favorecido pelas condições anaeróbicas do processo,

pela adição de sais de cura e açúcares e pelo pH reduzido na inicial da mistura, fatores que são bastante favoráveis para as BAL (Lüke, 2000; Yu *et al.*, 2012).

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza e são, na generalidade, reconhecidas como geralmente seguras (GRAS, do inglês *Generally Recognized as Safe*) pela FDA (Food and Drug Administration) e por isso têm sido utilizadas no processamento de alimentos fermentados ao longo dos séculos (Ammor, Flórez & Mayo, 2007; Essid *et al.*, 2008; Carbonera *et al.*, 2010).

Dentro deste grupo existe um grande número de espécies. Em natureza existem: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*, sendo no entanto as mais representativas: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (Carr, Chill & Maida, 2002; Axelsson, 2004).

Todas as Bactérias Ácido Lácticas têm em comum a sua morfologia, nomeadamente a sua conformação de cocos ou bacilos, serem Gram-positivas, não formarem esporos, não produzirem catalase e oxidase, serem anaeróbias produzindo ácido láctico como único ou principal produto metabólico final. São geralmente mesófilas, apesar de se conseguirem desenvolver entre os 5 e os 45 °C. Têm uma elevada tolerância à variação de pH, podendo existir espécies com um pH ideal de 3,2 e outras com 9,6 (Hassan & Frank, 2001; Axelsson, 2004).

Metabolicamente podem ter duas classificações homofermentativas ou heterofermentativas. As homofermentativas metabolizam as hexoses dos hidratos de carbono produzindo, por mol de glicose, duas moles de lactato. Dentro desta classe encontram-se *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e alguns *Lactobacillus*. Já as heterofermentativas utilizam outras fontes de carbono além das hexoses produzindo lactato, CO₂, etanol, ácido acético, entre outros. Esta classe engloba *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* e alguns *Lactobacillus* (Caplice & Fitzgerald, 1999; Axelsson, 2004; Jay, 2005).

Os produtos resultantes do metabolismo das BAL são um dos principais motivos da importância destas na tecnologia de produção dos fermentados cárneos, pois são eles os responsáveis pelas alterações referidas anteriormente durante a fermentação.

A ação destas bactérias sobre os hidratos de carbono, presentes e/ou adicionados à massa cárnea, gera ácido láctico e este é responsável pela diminuição acentuada do pH destes produtos, podendo-se situar próximo de 4 (Piard, Le Loir, Poquet & Langella, 1999; Carbonera & Espirito Santo, 2010). Esta acidificação do meio impede a capacidade de ligação

das proteínas musculares à água (devido ao valor de pH ser inferior ao ponto isoelétrico das mesmas) e provoca a coagulação proteica, afetando positivamente a perda de água, a secagem, a textura e a fiabilidade do produto final. Estas bactérias produzem também um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas. Todos estes fatores são os responsáveis pelo *flavor*, textura, aspeto, cheiro e cor tão característicos destes produtos cárneos fermentados (Hames, Bantleon & Min, 1990; Essid *et al.*, 2008; Velho *et al.*, 2013). Outro efeito benéfico da atividade das BAL é a capacidade de produzirem compostos antimicrobianos como: ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas; que conjugados com a acidez impedem o desenvolvimento e inativam agentes indesejáveis e patogénicos nestes produtos (Piard *et al.*, 1999; Campagnol *et al.*, 2007; Essid *et al.*, 2008).

O resultado tecnológico da interação de todos estes fatores é um produto final altamente fiável, duradouro e seguro.

2.3.1. Género *Lactobacillus*

Dentro do grupo das Bactérias Ácido Lácticas, o género *Lactobacillus* é um dos que apresenta maior relevância, estando geralmente presente quer naturalmente quer nas culturas *starter* utilizadas na tecnologia de fabrico dos enchidos. Tal como os outros géneros no grupo das BAL, os *Lactobacillus* apresentam uma forma de bacilos, não são esporulados e produzem ácido láctico como único ou principal produto da sua fermentação (Prescott, Harley & Klein, 2005). Têm uma temperatura ótima de multiplicação entre os 30 e os 40 °C, mas conseguem desenvolver-se entre os 5 e os 53 °C e têm pH ótimo de crescimento de 5,5 a 5,8, mas crescem geralmente a pH abaixo de 5. Todos eles têm necessidades nutricionais complexas e vastas (Batt, 1999).

Este género pode ser dividido em três grandes grupos: i) *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios, que utilizam apenas as hexoses para produzirem ácido láctico (*L. delbrueckii subs. bulgaricus.*, *L. delbrueckii subs. lactis* e *L. helveticus*); ii) *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos facultativo, fermentando outras fontes de carbono além das hexoses para produzir ácidos orgânicos, CO₂, álcool e acetileno (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum*) e por fim iii) *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos obrigatórios, que forçosamente utilizam hexoses e pentoses como fontes de carbono, fermentando as primeiras a ácido láctico, acético, etanol e CO₂ e as segundas a ácido láctico e acético, respetivamente (*L. brevis* e *L. fermentum*) (Fox, Guinee, Cogan & McSweeney, 2000).

A utilização dos *Lactobacillus* na indústria alimentar é bastante variada e indispensável, estando envolvidos na produção de produtos vegetais fermentados (*choucroute*, pickles, silagem), bebidas (cerveja, vinho, sumos), pão de massa azeda, queijo suíço e outros queijos duros, iogurtes, além dos produtos cárneos fermentados. Esta utilização ocorre por, este género bacteriano, ter as capacidades de transformação, descritas anteriormente, como a habilidade de aumentar a conservação, durabilidade e disponibilidade nutricional nos produtos finais além de modificar benéficamente o *flavor* e as características sensoriais durante a fermentação dos alimentos (Zago *et al.*, 2011).

Mas não existem só benefícios na utilização deste género de bactérias, pois uma utilização incorreta pode, por vezes, causar problemas no produto devido a alterações indesejáveis no *flavor* e no odor dos produtos referidos. Deste modo é da máxima importância orientar corretamente, a utilização destes microrganismos na fermentação impedindo este tipo de danos nos produtos (Prescott *et al.*, 2005).

Sendo ainda mais específico, dentro dos *Lactobacillus*, a espécie *L. plantarum* apresenta características que levam a uma preferência de utilização em produtos cárneos fermentados (Essid *et al.*, 2008).

2.3.1.1. *Lactobacillus plantarum* – caracterização e importância

A espécie *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria pertencente ao grupo das Bactérias Ácido Lácticas, Gram-positiva, não patogénica, com forma de bastão. O seu metabolismo é definido como mesofílico heterofermentativos anaeróbio facultativo, isto é, tem uma temperatura ótima de crescimento que ronda os 30 °C, utiliza várias fontes de carbono para formar os produtos de reação (ácido láctico e acético, CO₂, álcool e acetileno) e, apesar de preferir a inexistência de oxigénio, tolera a sua presença continuando a crescer e a realizar o seu metabolismo. Normalmente, isto é, sem presença de oxigénio, esta bactéria transforma açúcar em ácido láctico ou álcool através da fermentação. Já aquando da presença de oxigénio, esta bactéria converte-o em peróxido de oxigénio utilizando magnésio (Fox, *et al.*, 2000; Anónimo, 2009).

É uma espécie heterogénica e versátil que pode ser encontrada numa grande variedade de nichos ambientais, que incluem produtos lácteos (iogurtes, queijos), carne (produtos de salsicharia fresca e fermentada seca e/ou fumada), produtos da pesca fermentados e muitos vegetais fermentados. Isto ocorre porque é frequentemente utilizada na indústria de produção destes mesmos alimentos como cultura *starter* do processo de cura desejado (Zago *et al.*, 2011).

Este microrganismo encontra-se naturalmente na saliva e no trato gastrointestinal do Homem e o estudo genético feito sobre este tem sido bastante extenso, tendo sido o seu genoma totalmente sequenciado. Apesar de estar naturalmente presente no Homem, também tem a capacidade de, quando incorporado em alimentos, sobreviver ao reduzido pH do estômago e no duodeno e resistir aos efeitos dos sais biliares, o que permite que colonize o intestino do Homem e de outros mamíferos (Zago *et al.*, 2011).

Além dos benefícios tecnológicos que esta bactéria tem nos produtos, também tem sido alvo de uma grande quantidade de estudos por ter uma capacidade probiótica para o consumidor. A conjugação destes dois elementos explica a grande preferência da sua utilização pelas indústrias nos variadíssimos produtos alimentares fermentados, sendo a dos produtos cárneos uma das que a ela recorre (Prescott *et al.*, 2005).

Mas com a utilização em larga escala e com o aprofundar dos conhecimentos tecnológicos, observou-se que poderia existir uma transferência de elementos de resistência a antibióticos, veiculada por estas bactérias, o que se veio a confirmar. A partir desse momento a importância de conhecer e perceber os mecanismos de resistência ou de transmissão por parte deste tipo de microrganismos tornou-se uma preocupação e alvo das pesquisas científicas (Ammor & Mayo, 2007).

2.4. Resistência a antibióticos – nova preocupação

Desde a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, que o panorama médico e veterinário a nível global foi completamente transformado. Após esta descoberta, os cientistas conseguiram compreender melhor o mecanismo destes compostos, permitindo à indústria farmacêutica investigar, descobrir e criar, rapidamente, novos antibióticos contra várias bactérias causadores de infeções (Nicolau & Montagnon, 2008; Guimarães, 2009). O uso clínico de antibióticos levou a uma significativa redução da ocorrência de doenças infecciosas e de mortalidade associadas a doenças infecciosas, além do enorme impacto que teve no sucesso na cirurgia (Wegener, 2003; Levy and Marshall, 2004; Ammor *et al.*, 2007a).

Mas os bons resultados obtidos a partir do uso destes compostos levaram a uma extensa e generalizada utilização dos mesmos, muitas vezes em doses excessivas, durante longos períodos de tempo e com frequências de utilização elevadas e pouco espaçadas (Okeke, Lamikandra & Edelmant, 1999).

Com esta utilização massiva, rapidamente surgiram indícios de resistência por parte dos microrganismos patogénicos o que diminuiu a eficiência de ação dos antibióticos existentes. O aumento da frequência deste problema levou a que, nas últimas décadas novas abordagens na utilização de antibióticos fossem adquiridas para evitar o aparecimento de estirpes mais

resistentes e em maior número, aos antibióticos já criados e a novos. Deste modo passou a ser feita uma melhor e mais cuidada administração dos mesmos (Bronzwaer *et al.*, 2002; Fernandes, 2006).

A utilização de antibióticos estendeu-se também à medicina veterinária, à agricultura e ao controlo de doenças em plantas, o que contribuiu ainda mais para a disseminação de resistências às drogas utilizadas (Bronzwaer *et al.*, 2002). Nas últimas décadas, surgiu uma possível ligação entre a utilização de antibióticos em animais pecuários e o aparecimento de resistência nos microrganismos patogénicos humanos, o que despertou uma grande preocupação na comunidade científica e gerou muitas e novas investigações (Teuber, Meile & Schawarz, 1999; Salyers, Gupta & Wang, 2004)

Esta preocupação confirmou-se, permitindo compreender que ao expor os animais e consequentemente, a sua microbiota, a antibióticos, gerava o aparecimento de mecanismos de resistência nestas, facilmente passadas depois, desde o animal até aos produtos originários do mesmo e finalmente destes até ao consumidor através da cadeia alimentar. Assim as bactérias comensais passaram a ser consideradas veículos de transmissão de elementos de resistência para outras bactérias comensais e para bactérias patogénicas, representando assim um elevado risco para o consumidor (Gevers, Danielson, Huys & Swings, 2002; Ammor & Mayo, 2007).

Geralmente a utilização de antibióticos na indústria pecuária pode ser feita com o propósito de conferir saúde e bem-estar aos animais para atingir uma boa rentabilidade económica da atividade produtiva (animais saudáveis têm melhores índices de produção). A utilização de antibióticos como promotores de crescimento na produção dos animais foi proibida, pois o seu uso inapropriado contribuía consideravelmente para o aumento das resistências bacterianas levando a maiores dificuldades no tratamento de infeções animais e humanas. Até Janeiro de 2006, a União Europeia proibiu, a utilização de produtos registados para o uso terapêutico em animais como promotores de crescimento na produção animal (Barton, 2000; Phillips *et al.*, 2004; Dibner & Richards, 2005; Phillips, 2007).

2.4.1. Modos de transmissão de resistência a antibióticos

Nos últimos 20 anos, as BAL passaram a ser alvo de um grande interesse devido à importância da sua utilização como culturas *starter* e na potencial utilização como agentes próbióticos. Por este motivo tornou-se necessário um melhor conhecimento da sua fisiologia, da sua genética e do seu comportamento tecnológico, para que no caso de ambas as utilizações a segurança fosse garantida. Dos muitos dados obtidos durante estas décadas de pesquisa, percebeu-se que estas bactérias tinham potencial para transferir resistências a antibióticos (Ammor *et al.*, 2007a)

Atualmente é descrita em praticamente todas as espécies bacterianas a existência de resistência a antibióticos e esta dá à bactéria uma vantagem de sobrevivência na presença de um determinado antibiótico (Hayes & Wolf, 1990; Tavares, 2000). A resistência aos antibióticos pode ocorrer devido a vários mecanismos diferentes que incluem: i) diminuição da absorção do antibiótico, ii) aumento da expulsão do antibiótico, iii) inativação ou modificação do alvo antibiótico, iv) introdução de um novo alvo de resistência, v) hidrólise do antibiótico, vi) modificação do antibiótico, e vii) prevenção da ativação do antibiótico. Estes mecanismos podem ter origem intrínseca ou adquirida (Normark & Normark, 2002).

A resistência intrínseca a um antibiótico pode ter origem na própria bactéria ou no género a que pertence, isto é, ocorrendo de forma inerente ou natural quando na presença desse mesmo antibiótico e não é transmitida horizontalmente para outras bactérias. Já a resistência adquirida é encontrada em algumas estirpes pertencentes a uma dada espécie, que apresenta na generalidade sensibilidade ao antibiótico. Esta resistência pode ocorrer de dois modos: i) através de mutações no genoma bacteriano ou ii) através da aquisição de genes adicionais codificadores de mecanismos de resistência transferíveis horizontalmente (Levy & Marshall, 2004; Mathur & Singh, 2005). As alterações genéticas adquiridas alteram os mecanismos de defesa da célula, tornando-a capaz de superar o antibiótico, através da alteração da permeabilidade da membrana celular, inativação enzimática, transporte ativo do antibiótico, modificações no próprio antibiótico ou por alteração do objectivo metabólico do antibiótico (Davies, 1997; Poole, 2002).

A mutação é uma alteração que ocorre na informação genética da própria bactéria devido a erros ocorridos durante a replicação do cromossoma bacteriano, podendo existir inserção, perda ou alteração de segmentos de ADN. As mutações não ocorrem devido à presença dos antibióticos, exceto quando estes têm capacidades mutagénicas, mas a sua presença pode causar a seleção dos mutagénicos numa população bacteriana (Smith & Lewin, 1993; Robert-Dernuet, 1995; Trieu-Cuot & Poyart, 1998).

Os genes de resistência podem ter origem em agentes antimicrobianos, portadores de genes de resistência para autoproteção contra os compostos antimicrobianos produzidos por eles próprios ou em genes responsáveis por mecanismos importantes no metabolismo das bactérias, que sofreram gradualmente mutações que geravam alterações nos substratos necessários aos antibióticos (Davies, 1994; Davies, 1997; Mathur & Singh, 2005).

A aquisição de elementos genéticos exógenos deve-se principalmente à transmissão de genes das estruturas genéticas móveis que os contêm, nomeadamente plasmídeos e transposões (Jacoby & Archer, 1991).

Os plasmídeos são elementos genéticos extra cromossômicos, com uma cadeia dupla, de forma circular e de tamanho pequeno. Estes replicam-se de forma independente do cromossoma do hospedeiro e possuem um número limitado de genes específicos, capazes de suplementar a informação genética da bactéria. A informação por eles transportada pode tornar-se essencial para a sobrevivência da bactéria, como por exemplo, a produção de toxinas, a tolerância a metais tóxicos e a resistência a antibióticos. Muitas das propriedades importantes das LAB (atividade proteolítica, produção de bacteriocinas e imunidade, produção das primeiras enzimas no metabolismo da lactose, habilidade de transportar citrato e resistência ao ataque de bacteriófagos), têm origem na codificação genética a partir de plasmídeos, existindo vários, sobre os quais as funções ainda não são conhecidas (Cogan, 1999; Ammor *et al.*, 2007a). Plasmídeos codificadores de resistência (Plasmídeos-R) à tetraciclina, à eritromicina e outros macrólidos, ao cloranfenicol e à lincomicina foram relatados, por vários autores, em *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* e em *L. plantarum* isolados de carne crua, silagem e fezes (Mathur & Singh, 2005).

Já os transposições são sequências de ADN, em cadeia dupla, capazes de promover a sua própria transposição de um local genético para outro na cadeia de ADN (Pato, 1989). Além disso permitem também, a translocação de genes de resistência de um plasmídeo para outro, de um plasmídeo para o cromossoma de uma bactéria ou até, do cromossoma para um plasmídeo (Davies, 1993; Robert-Dernuet, 1995; Trieu-Cuot & Poyart, 1998).

Estas trocas de genes podem ocorrer de três formas diferentes: por conjugação, por transformação ou por transdução. A conjugação consiste num processo em que as bactérias se ligam entre si, trocando material genético uma com a outra, isto é, basicamente na “sexualidade” entre as bactérias. Neste processo os plasmídeos são normalmente transferidos do portador para o recetor mas por vezes há também movimentação de ADN cromossômico, no qual podem estar inseridos transposições. A transferência de plasmídeos-R entre espécies de BAL, de *Enterococos* e de *Staphylococcus* tem vindo a ocorrer com alguma frequência demonstrando que a alta promiscuidade destes elementos genéticos leva à possibilidade de transferência de unidades de resistência completa entre, pelo menos, microrganismos relacionados. Embora suficientemente documentada *in vitro*, tem vindo a ser, recentemente, especulado que os plasmídeos inteiros poderão não passar entre espécies bacterianas diferentes, mas apenas alguns genes (Sherley, Gordon & Collignon, 2003).

Em relação aos transposições conjugativos, não existem muitos relatos da sua associação com a resistência a antibióticos nas BAL, exceto para algumas espécies de *Enterococcus*. Estes conferiam resistência à tetraciclina, à eritromicina e ao cloranfenicol e demonstraram ter uma ampla capacidade de transferência por conjugação para bactérias Gram-positivas como *L.*

lactis subsp. lactis e para *Leuconostoc* (Perreten, Kolloffel & Teuber, 1997; Huys, D'Haene, Collard & Swings, 2004). De uma forma geral os transposões conjugativos parecem ter um papel extremamente importante na propagação de genes de resistência, porque ao contrário dos plasmídeos, não necessitam de se replicar, não sofrem exclusão nem possuem problemas de incompatibilidade (Ammor *et al.*, 2007a).

Na transformação há um processo de modificação genética da própria célula bacteriana devido à “absorção” de ADN do meio envolvente. A entrada de ADN é codificada pelos genes cromossômicos e sinalizada pelo meio ambiente, o que leva a que as bactérias sejam capazes de sofrer uma transformação natural.

Por fim a transdução é um processo genético que envolve a transferência de ADN de uma célula para outra através de um fago (bacteriófago). Durante este processo há trocas genéticas entre ambos os indivíduos, podendo existir passagem de plasmídeos e até partes cromossomais dos bacteriófagos para as bactérias (Miller, 1998; Garg & Sandhir, 1999). A transdução foi a primeira técnica de transferência de genes desenvolvidos e utilizados em laboratório para a transferência de sequências tecnologicamente importantes entre diferentes estirpes (Fitzgerald & Gasson, 1988).

2.5. Resistência a antibióticos em *Lactobacillus*

Entre os muitos produtos obtidos de animais expostos a antibióticos, a carne e seus produtos derivados, tais como os produtos cárneos fermentados secos, são ótimos representantes de fontes dos perigos identificados e descritos anteriormente. O grande número de BAL nos produtos fermentados e no trato gastrointestinal, do Homem e dos animais, contribui em larga escala para o aparecimento de diferentes mecanismos de resistência através de mutação e de aquisição de elementos de resistências provenientes de outras bactérias no ambiente (Ammor *et al.*, 2007a). Por este motivo os estudos de investigação concentraram-se na seleção de estirpes que possuíssem todas as características tecnológicas necessárias a uma cultura *starter* e que não tivessem elementos de resistência aos antibióticos (Gevers *et al.*, 2002; Danielsen & Wind, 2003).

De um modo geral, os *Lactobacillus* apresentam uma resistência natural ou intrínseca a antibióticos como: a bacitracina, a cefoxitina, a ciprofloxacina, o ácido fusídico, a canamicina, a gentamicina, o metronidazol, a norfloxacina, a estreptomicina, a sulfadiazina, a teicoplanina, o trimetoprim/ sulfametoxazol e a vancomicina (Bernardeau, Vernoux, Henri-Dubernet & Guégen, 2008). São geralmente sensíveis às penicilinas (ampicilina e piperaciclina) (Danielsen & Wind, 2003; Coppola *et al.*, 2005). A maioria das espécies de *Lactobacillus*

demonstra ter um elevado nível de resistência a glicopéptidos (vancomicina e teicoplanina), como mencionado acima.

Os *Lactobacillus* são geralmente susceptíveis a antibióticos que inibem a síntese de proteínas como o cloranfenicol, a eritromicina, a daltopristina/quimospristina, a lincomicina, a clindamicina e as tetraciclina (Charteris, Kelly, Morelli & Collins, 1998; Coppola *et al*, 2005; Zhou, Pillidge, Gopal & Gill, 2005). No entanto, foram identificadas estirpes resistentes a alguns destes compostos (cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina), constatando-se que genes de resistência estariam envolvidos neste fenómeno, assim tem-se vindo a estudar estes genes para uma melhor compreensão dos mesmos (Charteris *et al.*, 1998; Danielsen e Wind, 2003; Delgado, Flóres & Mayo, 2005; Flórez, Delgado & Mayo, 2005).

Para o cloranfenicol foi detetada a presença do gene de resistência *cat* (do inglês, *chloramphenicol acetyltransferases*) em *L. reuteri* (Lin, Fung, Wu & Chung, 1996), *L. acidophilus* e *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Hummel, Hertel, Holzapel & Franz, 2007), *L. johnsonii* (Mayrhofer *et al.*, 2010) e *L. plantarum* (Ahn, Collins-Thompson, Duncan & Stiles, 1992). No caso da eritromicina os genes de resistência, denominados por *erm* foram encontrados também em várias espécies, como a *L. fermentum*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. reuteri*, entre outras (Tannock *et al.*, 1994; Fons *et al*, 1997; Cataloluk & Gogebakan, 2004). A resistência à tetraciclina está associada a vários genes de resistência que têm vindo a ser descobertos, estando entre eles as *tets* (K), (L), (M), (P), (Q), (S), (W) e (36) presentes em várias espécies de *Lactobacillus* (Chopra & Roberts, 2001; Villedieu *et al.*, 2003; Roberts, 2005; Torres *et al.*, 2005; Huys, D'Haene & Swings, 2006).

2.5.1. Tetraciclina

A tetraciclina é um antibiótico que pode ter uma origem natural, obtida a partir de diversas espécies de *Streptomyces*, ou ser semissintética. Esta é responsável pela inibição da síntese proteica das bactérias, ao bloquear, nos ribossomas, o recetor da subunidade 30S que se liga ao tRNA durante a tradução génica (Clermont, Chesneau, Cespédès & Horaud, 1997; Pereira-Maia, Silva & Almeida, 2010).

A tetraciclina é um dos grupos de antibióticos que continua a ter uma grande utilização para o tratamento de uma grande variedade de infeções bacterianas (Thumu & Halami, 2012). Esta sua utilização abrange não só os humanos como também os animais (Clermont *et al.*, 1997).

A preferência de utilização destes antibióticos surgiu devido a várias características favoráveis existentes nas Tetraciclina, como por exemplo, ter um preço acessível, ter uma espectro de ação bastante eficiente e vasto contra vários tipos de bactérias, agentes patogénicos e alguns protozoários parasitários, a sua administração ser simples, normalmente por via oral e os

efeitos secundários resultantes da sua utilização serem poucos ou nenhuns (Standiford, 1990; Pereira-Maia *et al.*, 2010).

Estas vantagens levaram a uma utilização em larga escala da tetraciclina nos últimos 50 anos, o que justifica os elevados valores de resistência cada vez mais comunicados em diversos estudos portugueses e internacionais (Aarestrup, Agerso, Gerer-Smidt, Madsen & Jesen, 2000; Peters, Mac, Wichmann-Schauer, Klein & Ellerbroek, 2003; Novais *et al.*, 2005; Poeta, Costa, Rodrigues & Torres, 2006). Através de estudos percebeu-se que a exposição a pequenas concentrações de tetraciclina gerava seleção das estirpes com elementos de resistência e esta poderia também estimular a transferência de alguns elementos móveis que conferiam essa mesma resistência. Deste modo a utilização da tetraciclina tornou-se controversa e controlada, sendo agora somente utilizada no tratamento de infeções clínicas (Levy, 1988; Speer, Shoemaker & Salyers, 1992).

De acordo com a DANMAP (2006), o grupo das tetraciclinas foram as moléculas com maiores registos de utilização como agente terapêuticos na área veterinária, na Europa. Em Portugal, o INFARMED (2007) concluiu que, só no ano de 2006, foram utilizadas 40 toneladas de antibióticos da família das tetraciclinas na saúde de animais de companhia e de animais de produções pecuárias. Estes dados demonstram que a tendência será a existência de cada vez mais estirpes resistentes à tetraciclina e consequentemente uma maior potencial incidência de resistência por parte de microrganismos patogénicos aos antibióticos administrados. Isto é algo que a comunidade científica e agora também a indústria alimentar tentam contrariar, analisando, estudando e selecionando estirpes sem elementos genéticos de resistência para utilizar no fabrico de produtos fermentados.

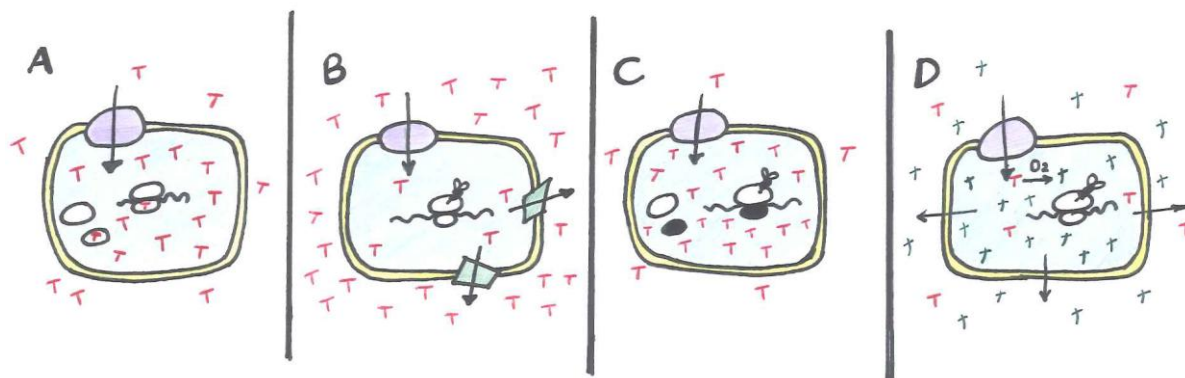
2.5.1.1. Mecanismos de resistência à Tetraciclina e base genética envolvida

As tetraciclinas são um grupo de antibióticos com um amplo espectro de ação. Esta molécula além de impedir a síntese proteica (Figura 1A) pode também causar efeitos na estabilidade do tRNA, na síntese do rRNA e no metabolismo de aminoácidos em adição indireta à inibição da síntese proteica. A resistência à tetraciclina (Tc^r) é a mais frequente na natureza e é adquirida geralmente através da transferência horizontal de genes (Cashel & Rudd, 1987; Ammor *et al.*, 2007).

As bactérias podem adquirir 3 diferentes estratégias ou mecanismos para se tornarem resistentes à tetraciclina: i) limitando o acesso da tetraciclina aos ribossomas (Figura 1B), ii) alterando os ribossomas para prevenir a ligação efetiva da tetraciclina (Figura 1C) ou iii) produzindo enzimas que inativam a tetraciclina (Figura 1D) (Speer, Shoemaker & Salyers, 1992). São conhecidos 37 genes de resistência à tetraciclina (*tet* e *otr*), 23 codificantes de

proteínas de bombas de efluxo, 11 codificantes de proteínas de proteção ribossomal e 3 que codificam enzimas de inativação (Roberts, 2005).

Figura 1 – Diferentes mecanismos de resistência à Tetraciclina (adaptado de Salyers, Speer & Shoemaker, 1990, citado por Speer, Shoemaker & Salyers, 1992).



Legenda: 1A – Célula sensível à tetraciclina (T), devido à acumulação de tetraciclina no interior da célula há ligação desta ao ribossoma, parando a síntese proteica; 1B – Bactéria portadora do gene de resistência por bomba de efluxo que origina uma proteína da membrana citoplasmática capaz de contrariar a acumulação de tetraciclina no interior da célula, o que permite a ocorrência da síntese proteica; 1C – Bactéria portadora do gene de resistência de proteção ribossomal que gera uma proteína citoplasmática capaz de interagir com os ribossomos e protege-los, o que permite a síntese proteica mesmo com grandes quantidade de tetraciclina no interior da célula; 1D – Bactéria portadora do gene de resistência por modificação que produz uma enzima que quimicamente (utilizando O₂ e NADPH) modifica a tetraciclina (de T para t) difundido a forma inativada livremente.

A limitação do acesso da tetraciclina aos ribossomos é causada por um processo chamado bomba de efluxo da tetraciclina. Este processo consiste na redução das concentrações do antibiótico no interior da célula, ao expeli-lo a uma velocidade igual ou superior á da entrada do mesmo dentro da célula. Todo este mecanismo é feito por proteínas da membrana citoplasmática, resultantes da transcrição do gene de resistência. Estas proteínas transportam a tetraciclina para o exterior da célula, utilizando energia. Todo este mecanismo previne claramente o grau de acumulação de tetraciclina nas células suscetíveis permitindo que a síntese proteica ocorra quase sem problemas (Speer, Shoemaker & Salyers, 1992; Pereira-Maia *et al.*, 2010).

Os genes de proteção ribossomal codificam uma proteína citoplasmática (72 kDa) que interage ou se associa com o ribossoma, tornando-o insensível á inibição da tetraciclina, permitindo a continuação da síntese proteica mesmo na presença do antibiótico. Este

mecanismo é mais difundido pelas populações microbianas que o anterior (Salyers, Speer & Shoemaker, 1990; Roberts, 2005).

Por último a inativação da tetraciclina é também a mais recente descoberta. Sabe-se que estes genes de resistência codificam proteínas citoplasmáticas (44 kDa) que modificam quimicamente a tetraciclina através de uma reação enzimática que necessita de oxigénio e NADPH. Inicialmente apenas se conhecia a *tet(X)* mas mais recentemente mais dois genes deste grupo foram descobertos (Speer, Shoemaker & Salyers, 1992; Roberts, 2005).

Cada um destes mecanismos pode estar presente individualmente na célula bacteriana ou até em conjunto, sendo observada a presença de vários genes de resistência numa única célula. Os mecanismos de bomba de efluxo e de proteção ribossomal são os mais observados nas bactérias demonstrando a existência de uma elevada transferência horizontal de genes. Os genes responsáveis por estes dois mecanismos foram também eles encontrados, quer em plasmídeos como em transposões. Os plasmídeos contribuem com certeza para a propagação da *tet(K)* e da *tet(L)* (genes de efluxo) entre bactérias Gram-positivas, enquanto que a *tet(M)* é mais encontrada nos cromossomas, logo propagadas por transposões (Speer, Shoemaker & Salyers, 1992; Oggioni, Dowson, Smith, Provvedi & Pozzi, 1996; Roberts, 2005). Estudos atuais têm vindo a demonstrar a presença da *tet(M)* também em plasmídeos mudando os conhecimentos estabelecidos até a data (Clermont *et al.*, 1997; Gevers, 2003; Danielsen, 2002).

Bismuth, Zilhao, Sakamoto, Guesdon & Courvalin (1990) reportaram que muitas estirpes de *Staphylococcus aureus* carregam a *tet(M)* e a *tet(O)*, enquanto outras carregam as *tet(K)*, *tet(L)* e a *tet(M)*.

Pelo menos 11 diferentes genes de resistência à tetraciclina foram detetados até à data em *Lactobacillus*. Nestes estão incluídos genes que codificam proteínas de proteção ribossomais: *tet(W)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(36)*; *tet(Z)*, *tet(O/W/32/O/W/O)* e *tet(W/S)*, e proteínas de bomba de efluxo de tetraciclina: *tet(K)* e *tet(L)* (Lahtinen *et al*, 2009). No caso da resistência à tetraciclina em *Lactobacillus* existe geralmente uma associação com a presença da *tet(M)*, mas recentemente o gene, que codifica o mecanismo de efluxo, *tet(L)* foi descrito para alguns isolados (Ammor *et al.*, 2007).

3. Avaliação da Suscetibilidade a Antibióticos de *Lactobacillus plantarum* Isolados de Produtos de Salsicharia Tradicional Portuguesa

3.1. Objetivos e Justificação

As bactérias ácidas lácticas desempenham um papel fundamental na tecnologia de fabrico de vários produtos fermentados. Estas bactérias são responsáveis pela melhoria de vários aspetos do produto em fabrico. Nos produtos cárneos fermentados, como os enchidos, as BAL, nomeadamente os *Lactobacillus*, são a microbiota fermentativa dominante e responsável pelas alterações ocorridas durante a fermentação. Durante esta, os *Lactobacillus* metabolizam hidratos de carbono, produzindo entre outros compostos, ácido láctico que diminui drasticamente o pH, enzimas que transformam nutrientes e compostos antimicrobianos que impedem o crescimento de bactérias patogénicas. Deste modo o produto final possui várias características positivas, como a durabilidade, o *flavor*, a textura e o cheiro.

Devido á importância que os *Lactobacillus* têm nos produtos cárneos fermentados, é de extrema importância que as estirpes escolhidas tenham uma garantia de segurança para o consumidor, desempenhando as suas características protetoras sem prejudicar o Homem.

Este trabalho teve como objectivos: i) avaliar e definir o perfil de suscetibilidade de uma coleção de isolados de *L. plantarum* a um grupo de 9 antibióticos; ii) determinar a origem da resistência à Tetraciclina nas estirpes com um perfil de resistência.

Estes objectivos foram determinados para que posteriormente pudessem ser seleccionados os isolados com melhores resultados aos testes, para utilizá-los como possíveis culturas *starter* em produtos cárneos fermentados.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Coleção de isolados

O estudo realizado neste trabalho experimental teve como base isolados de *Lactobacillus* (n=84) pertencentes à coleção existente no Laboratório do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), da Universidade de Lisboa.

Estes isolados foram obtidos a partir de amostras de diferentes produtos de salsicharia tradicional portuguesa (paio, salsichão, salsichão grosso, linguiça, chouriço, chouriço de vinho e chouriço de carne), em várias fases de fabrico (massa inicial, meio de cura e produto acabado) e, a partir de superfícies do ambiente fabril (enchedora, misturadora e mesa de trabalho), de cinco indústrias diferentes situadas na região do Alentejo. Na tabela seguinte (Tabela 2) está descrita a origem/fábrica e o tipo de amostras recolhidas dos isolados estudados.

Tabela 2 – Descrição da origem fabril e de recolha de cada um dos isolados em estudo.

Origem/Indústria	Produto/ Superfície	Fase de Fabrico	Número de Isolados
A	Paio, Linguiça, Enchedora e Misturadora	Produto Acabado, Meio de Cura, Massa Inicial e Superfície	14
B	Salsichão, Linguiça e Paio	Produto Acabado	17
C	Chouriço, Enchedora e Mesa	Produto Acabado, Meio de Cura, Massa Inicial e Superfície	24
D	Chouriço de Vinho, Chouriço de Carne, Chouriço e Salsichão	Produto Acabado e Meio de Cultura	16
E	Linguíça e Enchedora	Produto Acabado, Meio de Cura e Superfície	13

Do conjunto total de isolados em estudo existiam dois subgrupos: um (n=50 isolados) em que a identificação de género e espécie tinha sido feita previamente noutros trabalhos realizados no Laboratório de Produtos de Origem Animal da FMV e um segundo (n=34 isolados) em que a identificação da espécie não tinha sido efetuada.

Todos os isolados encontravam-se acondicionados em “criotubos”, com BHI e 15% de Glicerol, a uma temperatura de -70 °C.

3.2.2 Identificação e caracterização genotípica dos isolados de *Lactobacillus*

3.2.2.1. Extração de ADN cromossomal

3.2.2.1.1. Cultivo dos isolados para o processo de extração

Para realizar a extração de ADN dos isolados foi necessário primariamente revivificar os mesmos de forma a ter culturas frescas (com menos de 48 horas). Assim sendo, todos os isolados foram semeados em placas com meio MRS 1,5% agar (MRS Agar, Sharlab S. L., Espanha) e incubados a 30 °C, durante um período de 24 a 48 horas em anaerobiose promovida por um gerador próprio para o efeito (Genbox anaer, bioMérieux França).

3.2.2.1.2. Processo de extração

O ADN cromossomal das bactérias foi extraído de acordo com o método do Tiocianato de Guadinidina (adaptado de Pitcher *et al.*, 1989). Foram recolhidas 2 a 3 ansas (1 µl) de cultura que foram suspensas em 1ml de Tampão TE 1x. A suspensão foi então centrifugada (Centrifuge 5415R, eppendorf AG, Alemanha) a 8000 rpm, durante 10 min, a 4 °C,

descartando-se o sobrenadante. Após este processo foi feita a ressuspensão das células em 250 µl de TE 1x com Lisozima (Applichem, Alemanha), sendo efectuada uma incubação em banho-maria a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente foram adicionados 500 µl da solução de Tiociano de Guanidina, seguindo-se um repouso de 10 min. Foram adicionados 250 µl de acetato de amónio 10M (Merck, Alemanha) como novo repouso de 10 min e 1 ml da mistura de clorofórmio e álcool amílico numa proporção de 24:1 (Merck, Alemanha). Efetuou-se uma centrifugação (Centrifuge 5415R, eppendorf AG, Alemanha) a 13000 rpm, durante 10 min, a 4 °C recuperando-se o sobrenadante. Neste foi adicionado 1 ml de Isopropanol (Sharlab S. L., Espanha) sendo efectuada nova centrifugação nas condições descritas com rejeição do sobrenadante.

Após lavagem do *pellet* com 1 ml de Etanol a 70%, centrifugou-se novamente deixou-se evaporar completamente o Etanol.

O armazenamento foi feito após a adição de 150 µl de TE 1x, a 4 °C até utilização.

3.2.2.1.2. Estirpes de controlo

As estirpes de controlo utilizadas nas diferentes reacções de PCR e PCR *Fingerprinting* formam: *L. plantarum* CECT 220 CSI, *L. curvatus* DSM 20019, *L. sakei* ATCC 15323, *L. plantarum* LMG 21684, *S. aureus* 124.1 e *S. aureus* Pr7/08, sendo os dois últimos gentilmente cedidos para Prof. Doutora Constança Pomba.

3.2.2.2. Metodologias de PCR

3.2.2.2.1. PCR para identificação do género *Lactobacillus*

Para determinar o género dos isolados foi realizada uma reacção PCR de acordo com a metodologia descrita por Dubernet, Desmasures and Guéguen, (2002). Neste protocolo foram utilizados os *primers*, descritos na Tabela 3.

Tabela 3 –*Primers* utilizados na reacção PCR para identificação de género *Lactobacillus*.

Denominação do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>
Lb MA1- rev	5'-CTCAAAACTAAACAAAGTTTC-3'
R16-1	5'-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3'

A reacção de PCR foi realizada num volume total de 25 µl, utilizando-se as seguintes concentrações dos diversos componentes: 2,5 µl de 1x Tampão (10x Reaction Buffer), 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de mix dNTP's (dNTP set 100mM Nzytech, Portugal), 0.13 µM de ambos os *primers* e 0.2 U/ µl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polymerase). A amplificação

de ADN foi efetuada no termociclador VWR Dpio (VWR, Bélgica), utilizando os seguintes parâmetros: 95 °C durante 5 min para a desnaturação inicial; 30 ciclos de 30 s a 95 °C (desnaturação), 30 s a 50 °C (annealing) e 30 s a 70 °C (extensão); a finalização foi efetuada durante 7 min a 72 °C e o armazenamento a 4 °C. O amplicon produzido foi de aproximadamente 250 pb. Como controlos positivos foram utilizadas as estirpes de referência *L. plantarum* CECT 220 CSI, *L. curvatus* DSM 20019 e *L. sakei* ATCC 15323.

Para revelação dos produtos de PCR amplificados foi realizada uma eletroforese. Sendo 5 µl de produto da reação PCR colocado em gel de Agarose (SeaKem LE Agarose, Lonza, USA) a 1,5% em TBE 1x., adicionando-se 2 µl de Azul de Bromofenol (USB Corporation, USA) e 2 µl de Gel Red (Nucleic Staining Acid Solution, iNtRON Biotechnology, Coreia). A corrida de electroforese foi realizada a uma voltagem de 90 V, durante 50 min, numa tina própria (VWR, USA). Posteriormente os géis foram observados por transiluminação em ultravioleta (ImageMaster, Pharmacia Biotech).

3.2.2.2.2. PCR *Fingerprinting*

A metodologia utilizada para o PCR *Fingerprinting* teve como base a metodologia descrita por Versalovic, Schneider, Bruijn & Lupski (1994). Como *primer* de repetição desta reação foi escolhido o (GTG)₅ (STABvida, Portugal) descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - *Primer* utilizado na reação PCR *Fingerprinting*.

Denominação do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>
(GTG) ₅	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'

A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 µl, utilizando-se as seguintes concentrações dos diversos componentes: 2,5 µl de 1x Tampão (10x Reaction Buffer), 3.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de mix dNTP's (dNTP set 100mM Nzytech, Portugal), 2.0 mM do *primer* e 0.2 U/ µl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polymerase). A amplificação de ADN foi efetuada no termociclador VWR Dpio (VWR, Bélgica), utilizando os seguintes parâmetros: 95 °C durante 5 min para a desnaturação inicial; 40 ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturação), 2 min a 40 °C (annealing) e 2 min a 20 °C (extensão); a finalização foi efetuada durante 10 min a 72 °C e o armazenamento a 4 °C. Como controlo positivo foi utilizada a estirpe de referência *L. plantarum* CECT 220 CSI.

Para revelação dos produtos de PCR amplificados foi realizada uma eletroforese. Sendo 5 µl de produto da reação PCR colocado em gel de Agarose (SeaKem LE Agarose, Lonza, USA) a 1,5% em TBE 1x., adicionando-se 2 µl de Azul de Bromofenol (USB Corporation, USA) e 2

µl de Gel Red (Nucleic Staining Acid Solution, iNtRON Biotechnology, Coreia). A corrida de electroforese foi realizada a uma voltagem de 80 V, durante 90 min, numa tina própria (VWR, USA). Posteriormente os géis foram observados por transiluminação em ultravioleta (ImageMaster, Pharmacia Biotech) e fotografados para posterior análise.

3.2.3. Caraterização da sensibilidade dos isolados a antibióticos

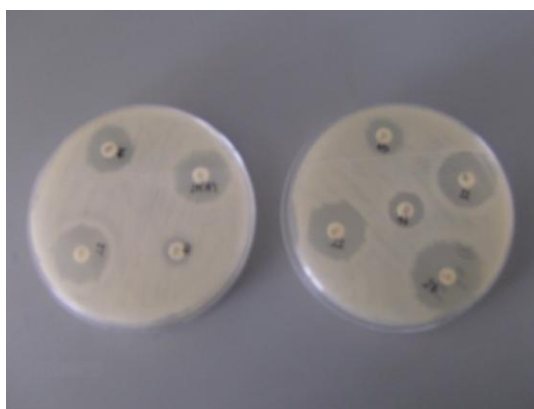
3.2.3.1. Teste de sensibilidade a antibióticos

Os isolados foram sujeitos ao método de difusão em disco para determinar a sua sensibilidade a diferentes antibióticos.

Foram utilizados 9 antibióticos (Oxoid, Reino Unido) neste teste: Vancomicina (30 µg), Penicilina G (10 UI), Eritromicina (15 µg), Tetraciclina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Daltopristina/ Quimospristina (15 µg), Rifampicina (5 µg), Lincomicina (15 µg) e Cloranfenicol (30 µg).

Cada um dos isolados foi previamente revivificado utilizando placas de MRS Agar (MRS Agar, Sharlab S. L., Espanha), a 30 °C, em anaerobiose, durante 48 horas. A partir desta cultura foi efetuada uma suspensão, em soro fisiológico de forma a obter um padrão de MacFarland de aproximadamente 0,5. A suspensão foi inoculada em placas de Muller-Hinton Agar (Sharlab S. L., Espanha) utilizando zaragatoas para espalhamento à superfície. Após este passo os discos comerciais dos antibióticos em análise foram colocados. As placas foram então incubadas a 30 °C, durante 48 horas, em anaerobiose. A leitura dos halos formados em redor dos discos de antibióticos foi efetuada (Figura 2), medindo em milímetros o diâmetro dos mesmos.

Figura 2 – Halos de inibição formados pela presença dos discos de antibióticos.



Os isolados foram classificadas como Sensíveis (S), de Sensibilidade Intermédia (I) ou Resistentes (R) para cada um dos antibióticos em estudo de acordo com os critérios definidos por CLSI (2008) e CA-SFM (2010), descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - *Cutoff points* dos Antibióticos testados.

Antibióticos	Resistente (mm)	Intermédio (mm)	Sensível (mm)
Vancomicina	-	-	≥15
Penicilina G	≤28	-	≥29
Eritromicina	≤13	entre 14 e 22	≥23
Tetraciclina	≤14	entre 15 e 18	≥19
Gentamicina	≤13	entre 14 e 17	≥18
Dalto./Quimispristina	≤18	entre 19 e 20	≥21
Rifampicina	≤16	entre 17 e 19	≥20
Lincomicina	≤14	entre 15 e 20	≥21
Cloranfenicol	≤12	entre 13 e 17	≥18

3.2.3.2. Estirpes de controlo

Como controlos de qualidade na execução do método foram utilizadas as estirpes de referência *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC e *Enterococcus faecalis* 29212 ATCC. Estas foram sujeitas à mesma metodologia que todos os isolados estudados, tendo sido incubadas respetivamente a 37 °C durante 24 horas e a 37 °C durante 48 horas, em aerobiose.

3.2.4. Caracterização genética da resistência dos isolados à Tetraciclina

3.2.4.1. PCR de deteção da presença do gene associado à produção de proteína de proteção ribossomal (RPP)

Para pesquisar a presença do gene associado à produção de proteína de proteção ribossomal - RPP nos isolados analisados foi utilizada a metodologia descrita por Genvers, Danielsen, Hyus & Swings (2003). Com esta metodologia pretende-se detetar a presença de genes inespecíficos associados à produção de proteína de proteção ribossomal que conferem resistência ao antibiótico, sendo referida a sua associação a plasmídeos. Assim quando existe o gene RPP o resultado é positivo e o isolado poderá ser um potencial portador de plasmídeo. Na Tabela 6 estão descritas as características dos *primers* utilizados.

Tabela 6 - *Primers* utilizados na reação PCR de Deteção da Presença do gene RPP.

Denominação do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>
DI	5'-GAYACNCCNGGNCA YRTNGAYTT-3'
DII	5'-GCCCARWANGGRTTNGGNGGNACYTC-3'

A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 µl, utilizando-se as seguintes concentrações dos diversos componentes: 2,5 µl de 1x Tampão (10x Reaction Buffer), 1.5

mM MgCl₂, 0.2 mM de mix dNTP's (dNTP set 100mM Nzytech, Portugal), 20 pmol/μl de ambos os *primers* e 1.0 U/ μl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polymerase). A amplificação de ADN foi efetuada no termociclador VWR Dopio (VWR, Bélgica), utilizando os seguintes parâmetros: 94 °C durante 5 min para a desnaturação inicial; 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 1 min a 55 °C (annealing) e 2 min a 72 °C (extensão); a finalização foi efetuada durante 10 min a 72 °C e o armazenamento a 4 °C. O amplicon produzido foi de aproximadamente 1083 pb. Como controlo positivo foi utilizada a estirpe de referência *L. plantarum* LMG 21684.

Para revelação dos produtos de PCR amplificados foi realizada uma eletroforese. Sendo 5 μl de produto da reação PCR colocado em gel de Agarose (SeaKem LE Agarose, Lonza, USA) a 1,5% em TBE 1x., adicionando-se 2 μl de Azul de Bromofenol (USB Corporation, USA) e 2 μl de Gel Red (Nucleic Staining Acid Solution, iNtRON Biotechnology, Coreia). A corrida de electroforese foi realizada a uma voltagem de 90 V, durante 50 min, numa tina própria (VWR, USA). Posteriormente os géis foram observados por transiluminação em ultravioleta (ImageMaster, Pharmacia Biotech) e fotografados para posterior análise.

3.2.4.2. PCR de detecção de presença dos genes de resistência *tet's* (M), (L) e (K)

Para detetar a presença dos genes de resistência à Tetraciclina, *tet's* (M), (L) ou (K) nos isolados analisados foi utilizada a metodologia descrita por Genvers, Danielsen, Hyus e Swings (2003). Neste protocolo foi feito um multiplex envolvendo os *primers* descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - *Primers* utilizados no multiplex de detecção de presença das *tet's* (M), (L) e (K).

	Denominação do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>
<i>tet</i> (M)	DI	5'-GAYACNCCNGGNCAYRTNGAYTT-3'
	<i>TetM-R</i>	5'-CACCGAGCAGGGATTTCTCCAC-3'
<i>tet</i> (L)	<i>TetL-FW3</i>	5'-GTMGTTGCGCGCTATATTCC-3'
	<i>TetL-RV3</i>	5'-GTGAAMGRWAGCCCACCTAA-3'
<i>tet</i> (K)	<i>TetK-FW1</i>	5'-TTATGGTGGTTGTAGCTAGAAA-3'
	<i>TetK-RV1</i>	5'-AAAGGGTTAGAACTCTTGAAA-3'

A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 μl, utilizando-se as seguintes concentrações dos diversos componentes: 2,5 μl de 1x Tampão (10x Reaction Buffer), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de mix dNTP's (dNTP set 100mM Nzytech, Portugal), 20 pmol/μl de cada *primer* e 0.5 U/ μl de Taq Polimerase (NzyTaq DNA Polymerase). A amplificação de ADN foi efetuada no termociclador VWR Dopio (VWR, Bélgica), utilizando os seguintes

parâmetros: 94 °C durante 5 min para a desnaturação inicial; 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 1 min a 55 °C (annealing) e 2 min a 72 °C (extensão); a finalização foi efetuada durante 10 min a 72 °C e o armazenamento a 4 °C. Os amplicons produzidos foram de aproximadamente 1513 pb (*tet(M)*), 696 pb (*tet(L)*) e 348 pb (*tet(K)*). Como controlos positivos foram utilizadas as estirpes de referência *L. plantarum* LMG 21684, *S. aureus* Pr7/08 e *S. aureus* 124.1. para confirmação dos produtos de reação PCR for efetuada uma sequenciação (Stabvida) após purificação utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Valencia, CA, USA). Através de BLAST (do inglês “Basic Local Alignment Search Tool”) foi confirmada a concordância dos produtos amplificados com a sequência de *primers* utilizada.

Para revelação dos produtos de PCR amplificados foi realizada uma eletroforese. Sendo 5 µl de produto da reação PCR colocado em gel de Agarose (SeaKem LE Agarose, Lonza, USA) a 1,5% em TBE 1x., adicionando-se 2 µl de Azul de Bromofenol (USB Corporation, USA) e 2 µl de Gel Red (Nucleic Staining Acid Solution, iNtRON Biotechnology, Coreia). A corrida de electroforese foi realizada a uma voltagem de 90 V, durante 50 min, numa tina própria (VWR, USA). Posteriormente os géis foram observados por transiluminação em ultravioleta (ImageMaster, Pharmacia Biotech) e fotografados para posterior análise.

3.2.5. Análise estatística

Os perfis genéticos resultantes da metodologia PCR *Fingerprinting* dos isolados foram analisados através do programa informático *Bionumerics Applied Math* (versão 4.61, Bélgica). Deste modo obteve-se o dendrograma de similaridade dos isolados. A sua construção foi feita utilizando o coeficiente de correlação de *Dice*, com uma otimização de 1%, com uma tolerância de correspondência das bandas de 1,75%, e com o método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA: Unweighted Pair Groups using Arithmetic averages), tendo uma reprodutibilidade de 10%.

Foi calculado o índice de diversidade (D) intraespecífica para cada um dos dendrogramas, utilizando o índice de Simpson’s (Hunter & Gaston, 1988), seguindo a fórmula:

$$D = \sum_{i=1}^s \frac{n_i (n_i - 1)}{N(N-1)}$$

Em que s é o número de grupos estabelecidos, n_i é o número de isolados por grupo e N é o número total de isolados estudados.

Foi também feita a análise dos perfis genéticos em conjunto com os perfis fenotípicos de sensibilidade a antibióticos utilizando o mesmo programa informático. Primariamente os

resultados de sensibilidade a antibióticos foram tratados individualmente utilizando o coeficiente de correlação Binário por combinação simples (Binary – Simple Matching), comum limite de conversão de 50%, e mais uma vez o método de aglomeração UPGA. Depois foi feita a conjugação de ambos os dados (PCR *Fingerprinting* e sensibilidade a antibióticos) através da média a partir das experimentações (average from experiments) também com o método de aglomeração UPGMA.

Os dados do tipo binário resultantes da avaliação à suscetibilidade dos isolados a cada um dos antibióticos em teste foram analisados recorrendo ao Proc GLIMMIX do programa SAS 9.2, utilizando como a transformação log-log como função de ligação (CLL link function), e o método QUAD para estimar os parâmetros do modelo linear generalizado. O modelo incluiu apenas a indústria de origem dos isolados como fator fixo. Em 2 casos, para a vancomicina e para a tetraciclina, foram detetados problemas de ajustamento dos modelos devido aos produtores respetivos, A e C, apresentarem todas as estirpes susceptíveis ou resistentes, respetivamente a estes antibióticos. Nestes casos de ausência de variabilidade de um dos grupos (extreme category data problems), os modelos não produzem ajustamentos adequados. O problema foi resolvido alterando em cada um dos casos um dos valores, nomeadamente, no caso da indústria A, alterou-se um caso de suscetibilidade para um de resistência, e para a indústria C o contrário, de resistente para suscetível.

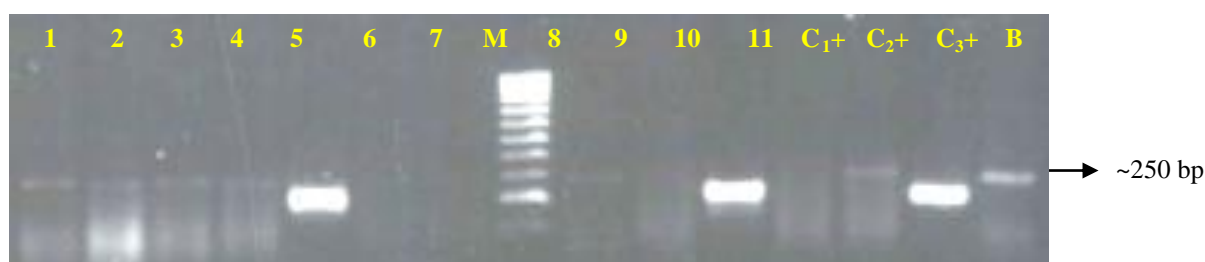
4. Resultados

4.1. Identificação e caracterização genotípica dos isolados de *Lactobacillus*

4.1.1. PCR para identificação do género *Lactobacillus*

Usando o protocolo descrito no tópico 3.1.3.1. deste trabalho, foi feita a identificação ao género dos 34 isolados sem género determinado. Todos os isolados que apresentaram um produto de reação PCR com aproximadamente 250 pb, foram caracterizados como pertencentes ao género *Lactobacillus*. Na Figura 3 podem-se observar isolados em que após amplificação PCR houve formação da banda esperada com 250 pb (*Lactobacillus*) e outros em que tal não ocorreu (não *Lactobacillus*).

Figura 3 – Exemplo de uma imagem de electroforese dos produtos amplificados no PCR para identificação do género *Lactobacillus*. Linhas (1) L1B1; (2) L1B3; (3) L2M5; (4) L2M7; (5) S4M1; (6) C3C1; (7) Ch2C1; (M) Marcador 100 pb; (8) P2B4; (9) S4M8; (10) S1B8; (11) Cv3C5; (C₁+) *L. curvatus* DSM 20019; (C₂+) *L. sakei* ATCC 15323; (C₃+) *L. plantarum* CECT 220 CSI; (B) Controlo Negativo.



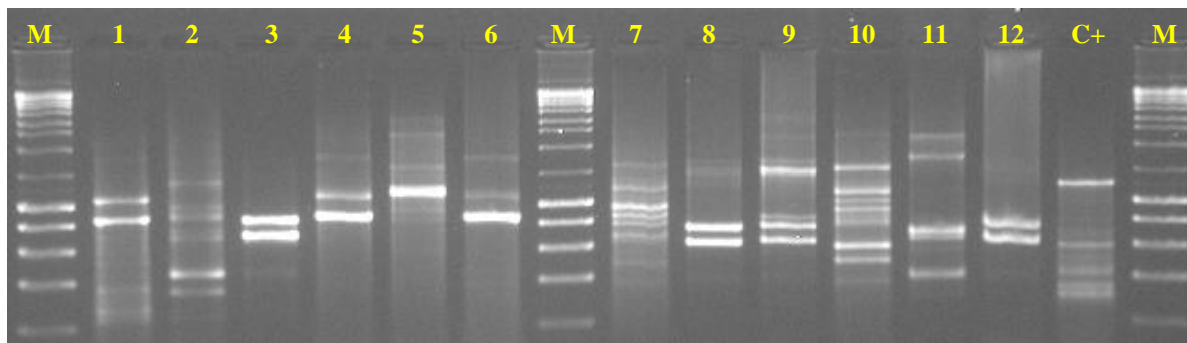
Dos 34 isolados analisados, apenas em 11,76 % (4 isolados: S4M8, Cv3C5, C3C1 e Ch2C1) não foi evidenciada a formação de banda após realização do PCR e, consequentemente, foram excluídos do grupo de isolados em estudo. Por outro lado 88,24% (n=30) dos isolados foram classificados como pertencentes ao género *Lactobacillus*.

4.1.2. PCR *Fingerprinting*

Após identificar todos os isolados pertencentes ao género *Lactobacillus* (n=80), procedeu-se à realização da metodologia de PCR *Fingerprinting* descrita no tópico 3.1.3.2. deste trabalho.

Na Figura 4 podemos observar uma das eletroforese realizadas aos produtos de reação PCR *Fingerprinting* de isolados em teste.

Figura 4 – Exemplo de imagem de electroforese dos produtos amplificados no PCR *Fingerprinting* de isolados de *Lactobacillus*. Linhas: (M) Marcador de 200 pb a 10000 pb; (1) P05-62; (2) P05-4; (3) 1L2-1; (4) P05-6; (5) P05-67; (6) P05-56; (7) P05-112; (8) 1L2-6; (9) P05-29; (10) 2L2-6; (11) Cv2C2; (12) 1L2-2; (C+) Controlo positivo – *L. plantarum* CECT 220 CSI.

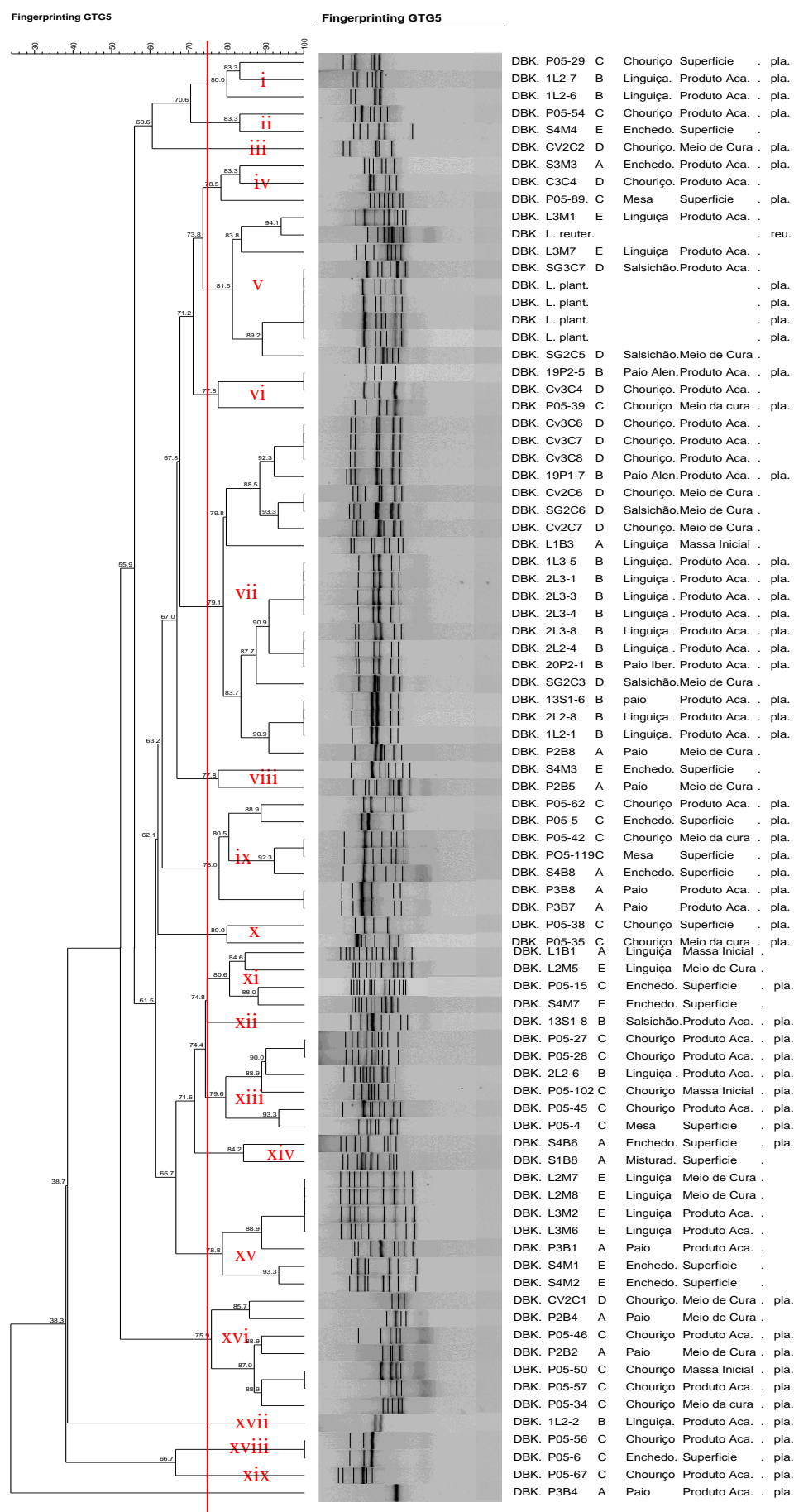


Em cada uma das reações foi utilizado o controlo positivo *L. plantarum* CECT 220 CSI, o que permitiu avaliar a reprodutibilidade do método. A análise de semelhança genética foi feita utilizando os perfis de *Fingerprinting* de cada um dos isolados com um tratamento de dados através de um programa computacional denominado *Bionumerics Applied Math*. O dendrograma obtido a partir da análise de semelhança entre os isolados em estudo pode ser observado na Figura 5.

O isolado P3B4 não se agrupa a qualquer um dos outros perfis genéticos. Este problema poderá ter ocorrido devido a uma falha na reação do PCR *Fingerprinting*, causada provavelmente pela não hibridação do *primer* a segmentos de ADN deste isolado. Tal problema poderia ser contornado se fosse utilizado outro *primer* de repetição como o M13 ou OPC-19, mas no presente estudo utilizou-se apenas o (GTG)₅. Apesar deste isolado não se conseguir associar a qualquer perfil genético, foi mantido em estudo fenotípico porque se trata de um *Lactobacillus plantarum* já identificado por PCR.

Na Figura 5 ao escolher *um cut off point* de 75% de similaridade observa-se a formação de 19 subgrupos de isolados. Também foi estabelecido que isolados com mais de 80% de semelhança poderiam ser considerados da mesma espécie e com mais de 90% poderiam ser considerados clones da mesma estirpe com o mesmo tipo de perfil genético.

Figura 5 – Dendrograma da análise do perfil genético das estirpes *L. plantarum* com identificação de grupos apresentando uma semelhança superior a 75%.



Vários aspetos podem ser referidos a partir do dendrograma: a) cada grupo tem entre 1 a 20 isolados; b) dentro de cada grupo a semelhança, entre os isolados, varia de 75% a 100%; c) na generalidade, os isolados sem espécie identificada, têm uma semelhança maior que 80% com isolados caracterizados como pertencentes à espécie *L. plantarum*, logo podem-se considerar pertencentes à mesma espécie; d) a exceção ao tópico anterior foram os isolados do subgrupo xv (maioria da indústria E) que tiveram apenas 66,7% de semelhança com isolados *L. plantarum* o que não permitiu definir com total certeza se estes pertenciam à espécie em questão, mas apesar disso foram mantidos na coleção; e o isolado L3M1 (indústria E) com uma semelhança de 94.1% com um *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 utilizado como espécie referenciada para identificação provável dos *Lactobacillus* que não tinham sido identificados à espécie, este foi retirado da lista de isolados em estudo fenotípico; e) o maior subgrupo, vii, contém isolados maioritariamente das indústrias B e D recolhidas a partir de produtos cárneos fermentados, secos e fumados; f) no grupo xiii, os isolados pertencem na maioria à indústria C, sendo apenas exceção o isolado 2L2-6 e; g) a existência de isolados com elevada similaridade, recolhidos de produtos e de superfícies, demonstrando a ocorrência de persistência destes mesmo após a higienização dos equipamentos do ambiente fabril (por exemplo P05-42 e P05-119).

Isolados com pelo menos 90 % de similaridade poderão ser considerados clones, assim 14 relações de igualdade foram observadas.

Contudo, nesta análise deve-se salientar a elevada diversidade de tipos de perfil-*Fingerprinting* encontrada no grupo de isolados da espécie *Lactobacillus plantarum* traduzida por um índice de Simpson's de 90%.

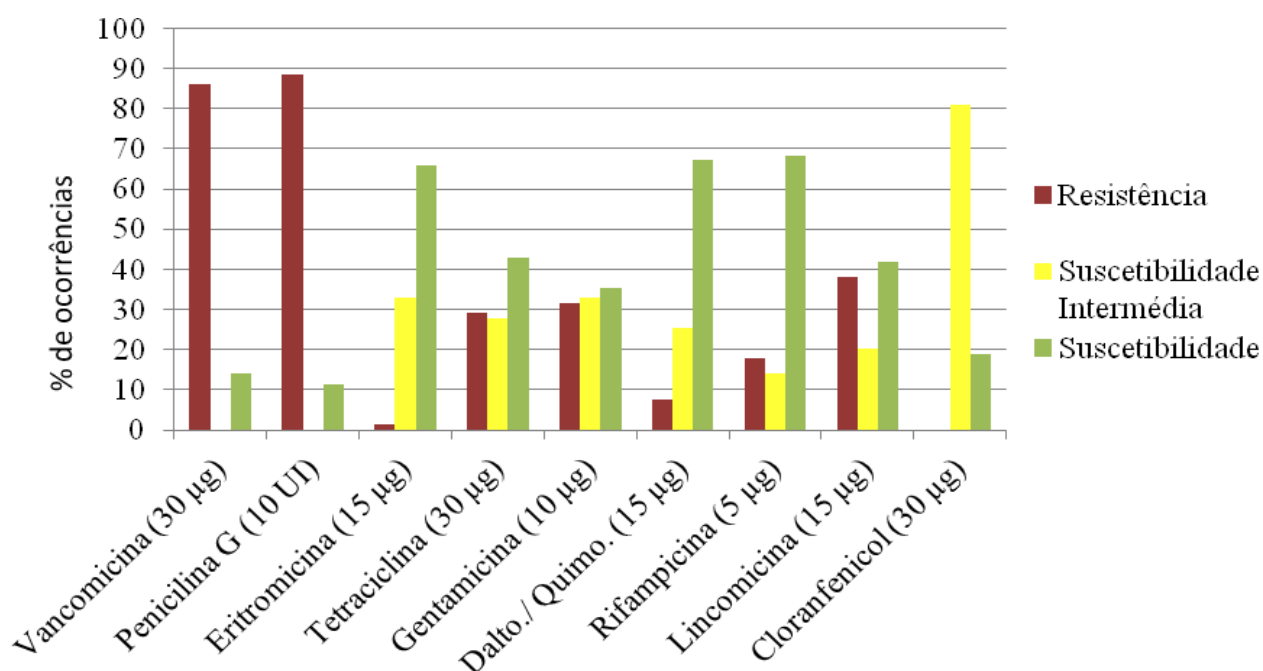
4.2. Caracterização da sensibilidade a antibióticos

4.2.1. Teste de sensibilidade a antibióticos

O total de isolados (n=79) foi analisado para a caracterização da sensibilidade a cada um dos 9 antibióticos em estudo: (Vancomicina (30 µg), Penicilina G (10 UI), Eritromicina (15 µg), Tetraciclina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Daltopristina/ Quimospristina (15 µg), Rifampicina (5 µg), Lincomicina (15 µg) e Cloranfenicol (30 µg)).

No Gráfico 1 apresenta-se a percentagem de isolados com resistência, suscetibilidade intermédia e suscetibilidade a cada um dos antibióticos testados. Observou-se que, de um modo geral 33,33% dos isolados em estudo apresentaram resistência a estes antibióticos.

Figura 6 – Percentagem de Isolados com Resistência, Resistência Intermédia e Suscetibilidade a cada um dos antibióticos testados.



Constatou-se que os isolados de *Lactobacillus plantarum* em estudo, apresentaram uma maior frequência de resistência à vancomicina (86,08%) e à penicilina (88,61%). Já o cloranfenicol (100%), eritromicina (98,73%), daltopristina/quimospristina (92,41%) e rifampicina (82,28%) foram os antibióticos aos quais um maior número de isolados foram suscetíveis.

Quando os isolados estudados foram agrupados pela sua origem fabril podemos observar na Tabela 8 as frequências obtidas relacionadas com a suscetibilidade encontrada para cada antibiótico.

Tabela 8 – Percentagem de isolados de *Lactobacillus* agrupados pela origem fabril apresentando suscetibilidade aos antibióticos em estudo.

Antibiótico	Percentagem de isolados suscetíveis por indústria (%)					Nível de Significância
	A n=14 (%)	B n=17 (%)	C n=24 (%)	D n=13 (%)	E n=11 (%)	
Vancomicina	7,14 ^b	5,88 ^b	0 ^b	15,4 ^b	63,6 ^a	*
Penicilina	7,14	17,7	4,17	23,1	0,09	NS
Eritromicina	100	100	100	100	90,9	NS
Tetraciclina	100 ^a	82,4 ^{ab}	62,5 ^b	84,6 ^{ab}	18,2 ^c	*
Gentamicina	57,1	64,7	79,2	61,5	72,7	NS
Dalto./ Quim.	92,9	100	87,5	84,6	100	NS
Rifampicina	71,4	100	66,7	92,3	90,9	NS
Lincomicina	71,4 ^a	82,4 ^a	33,3 ^{bc}	84,6 ^a	54,6 ^{ac}	*
Cloranfenicol	100	100	100	100	100	NS

*p<0,05; a,b,c - letras diferentes na mesma linha correspondem a médias significativamente diferentes.

Podemos observar que independentemente da sua origem todos os isolados foram susceptíveis ao cloranfenicol. Para a eritromicina tal também ocorreu, sendo a única exceção os isolados da indústria E, com uma suscetibilidade de 90,9%. Contudo não se considerou que houvesse diferença estatística entre as diferentes origens fabris. Igualmente para a daltopristina/quimospristina e rifampicina os valores de suscetibilidade foram elevados, variando entre 66,7% e 100%, para as diferentes indústrias de produção e não se diferenciando estatisticamente.

Para a Lincomicina constatou-se uma elevada suscetibilidade dos isolados, verificando-se que na indústria C os níveis de resistência foram significativamente mais elevados do que os observados nas indústrias A, B e D.

A suscetibilidade à tetraciclina encontrada nos isolados provenientes de diferentes indústrias foi também significativamente elevada, quando comparada com os valores encontrados nas indústrias C, 62,5%, e E, 18,2%.

É notório que a maior parte dos isolados foram resistentes à Vancomicina diferenciando-se significativamente contudo a indústria E, que apresentou valores de resistência em apenas 33,4% dos seus isolados em estudo.

Os isolados *Lactobacillus plantarum* das diferentes indústrias apresentaram elevada resistência à Penicilina.

4.3. Caracterização genética da resistência dos isolados à Tetraciclina

4.3.1. PCR de detecção do gene associado a proteínas de proteção ribossomal inespecíficas-RPP

Nos isolados *Lactobacillus* observou-se que, para o antibiótico tetraciclina 23 isolados apresentaram resistência, 22 suscetibilidade intermédia e 24 suscetibilidade. Esta resistência à tetraciclina pode estar relacionada com a presença de genes inespecíficos relacionados com a produção de proteínas de proteção ribossomal, tendo como alvo o gene *tet*(RPP), e estando descrita a sua associação a elementos genéticos móveis (Gevers, 2003).

Assim, efetuou-se a detecção da presença deste gene RPP o qual foi identificado em 2 (Tabela 9) dos isolados (2,53%) de *Lactobacillus plantarum* analisados. Estas estirpes apresentaram após amplificação a formação de uma banda aproximadamente nos 1083 pb.

Tabela 9 - Isolados que apresentaram a presença do gene alvo RPP.

	Gene RPP	Origem	Superfície/ Produto	Estádio
2L3-8	+	B	Linguiça	Produto Acabado
S4M4	+	E	Enchedora	Superfície

4.3.2. PCR de detecção dos genes de resistência *tet*'s (M), (L) e (K)

Na tabela 10 listam-se as estirpes de *Lactobacillus* que amplificaram por PCR os genes de resistência à tetraciclina, *tet*(M), específico para o mecanismo relacionado com a produção de proteínas protetoras ribossomais e *tets*(K) e (L) relacionados com a regulação da bomba de efluxo para a tetraciclina.

Do conjunto estudado neste trabalho (n=79) 38 isolados demonstraram ter pelo menos um dos genes de resistência à tetraciclina *tet*(M), *tet*(K) ou *tet*(L).

O gene de resistência à tetraciclina, *tet*(M) foi observada em apenas 2 isolados, ambos da indústria B. Já o gene de resistência *tet*(K) teve uma incidência em 36 isolados das indústrias A, B, C e E (22,2% na indústria A, 25% na B, 36,1% na C e por fim 16,7% na E). A *tet*(L) teve 2 isolados positivos, pertencentes à indústria B (2,53%). Deste modo observamos que apenas a indústria B teve isolados onde foi detetada a presença dos três genes de resistência e que a seguir a indústria C foi a que maior incidência de genes de resistência teve, nomeadamente da *tet*(K).

De todos estes isolados nenhum apresentou os três genes de resistências em simultâneo, mas 1 deles, 13S1-6, apresentou em simultâneo a *tet*(M) e a *tet*(L) e outro, 2L2-8, a *tet*(K) e a *tet*(L).

Tabela 10 – Lista de estirpes *Lactobacillus* onde foram detetados os genes de resistência à tetraciclina *tets*(M), (L) e (K).

Estipe	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (K)	<i>tet</i> (L)	Origem	Estipe	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (K)	<i>tet</i> (L)	Origem
13S1-8	+	-	-	B	1L3-5	-	+	-	B
P3B7	-	+	-	A	2L2-4	-	+	-	B
13S1-6	+	-	+	B	2L2-6	-	+	-	B
2L2-8	-	+	+	B	2L3-1	-	+	-	B
S4B8	-	+	-	A	2L3-3	-	+	-	B
P05-27	-	+	-	C	2L3-4	-	+	-	B
P05-28	-	+	-	C	20P2-1	-	+	-	B
P05-38	-	+	-	C	P2B2	-	+	-	A
P05-15	-	+	-	C	L1B1	-	+	-	A
P05-45	-	+	-	C	L2M5	-	+	-	E
P05-62	-	+	-	C	L2M7	-	+	-	E
P05-50	-	+	-	C	L2M8	-	+	-	E
P05-54	-	+	-	C	L3M2	-	+	-	E
P05-6	-	+	-	C	L3M6	-	+	-	E
P05-42	-	+	-	C	L3M7	-	+	-	E
P05-35	-	+	-	C	P2B4	-	+	-	A
P05-4	-	+	-	C	P2B5	-	+	-	A
P05-89A	-	+	-	C	P3B1	-	+	-	A
1L2-7	-	+	-	B	S1B8	-	+	-	A

4.3.3. Suscetibilidade fenotípica à Tetraciclina e presença de genes de resistência *tets* RPP, M, K e L

Ao cruzar todos os resultados recolhidos em relação à expressão fenotípica da resistência à tetraciclina e à presença de genes envolvidos nessa resistência, foram encontrados vários grupos de isolados: i) resistentes à tetraciclina e sem genes de resistência ii) suscetíveis à tetraciclina e sem genes de resistência; iii) resistentes à tetraciclina e apenas com genes codificantes de proteínas de proteção ribossomal (RPP); iv) suscetíveis à tetraciclina e apenas com genes codificantes de proteínas de proteção ribossomal (RPP); v) resistentes à tetraciclina e com pelo menos um dos genes codificantes de proteínas da bomba de efluxo e; vi) suscetíveis à tetraciclina e com pelo menos um dos genes codificantes de proteínas da bomba de efluxo, tal como apresentado na Tabela 11.

Do grupo de isolados que não continham genes de resistência (n=39), 69,23% eram suscetíveis à tetraciclina e 30,77% resistentes. Apenas 4 isolados demonstraram ter genes

codificantes de RPP, 2 continham a *tet*(RPP) e os outros 2 a *tet*(M). No primeiro grupo um dos isolados (2L3-8) demonstrou suscetibilidade fenotípica à tetraciclina, já no segundo ambos os isolados apresentaram resistência a este antibiótico (13S1-6 e 13S1-8). Deste modo 10,26% do grupo total de isolados apresentou genes que codificam proteínas de proteção ribossomal contra a tetraciclina.

Do grupo de isolados contendo genes codificantes de proteínas de bomba de efluxo, 36 continham os genes *tet*(K) e 2 a *tet*(L). Dos isolados com o gene *tet*(K), 77,77% apresentaram suscetibilidade, tal como 50% dos isolados que continham o gene *tet*(L).

De todos os isolados apenas o 13S1-6 demonstrou possuir genes das duas classes (RPP e Bomba de efluxo) e manifestou resistência à tetraciclina. Já o isolado 2L2-8 apresentou os dois genes codificantes de proteína de bomba de efluxo, mas demonstrou ser suscetível fenotipicamente.

Avaliando o grupo de isolados pela unidade fabril de origem, observa-se que a maior percentagem de isolados suscetíveis (39,24%) e sem genes de resistência à tetraciclina ocorreu na indústria D, particularmente em isolados provenientes de chouriço de vinho. Já isolados com pelo menos um dos genes de resistência ocorrem nas indústrias B e C. Na indústria B, é na linguiça que aparece a maioria dos isolados suscetíveis carregando o gene *tet*(K), enquanto que na indústria C tal ocorre em isolados provenientes do chouriço.

Ao observar quais os produtos que contêm maior número de isolados portadores de genes de resistência concluímos que na indústria A tal ocorre no Paio, mas nenhum dos isolados apresentou resistência fenotípica à tetraciclina; na indústria B é a Linguiça, mas também neste caso os isolados demonstraram ser suscetíveis à tetraciclina; para a indústria C foram os isolados do chouriço que se destacaram, com 2 isolados resistentes e 7 sensíveis; por fim a indústria E teve apenas isolados com estas características na linguiça, sendo 5 resistentes e 1 susceptível à tetraciclina.

Tabela 11 – Tabela resumo dos resultados relacionados com a expressão fenotípica da suscetibilidade à tetraciclina, detecção de genes de resistência *tets* RPP, M, K e L.

Indústria	Número de Isolados	Produto/ Superfície de Recolha	Número Isolados que não apresentaram Genes de Resistência a Antibióticos		Gene de Resistência Proteção Ribossomal				Genes de Resistência por Bombas de Efluxo			
					Número de Isolados com RPP		Número de Isolados com <i>tet</i> (M)		Número de Isolados com <i>tet</i> (K)		Número de Isolados com <i>tet</i> (L)	
			Resistentes	Suscetíveis	Resistentes	Suscetíveis	Resistentes	Suscetíveis	Resistentes	Suscetíveis	Resistentes	Suscetíveis
A	14	Paio		3						5		
		Linguiça		1						1		
		Enchedora		2						1		
		Misturadora								1		
B	17	Salsichão		3			2a				1a	
		Linguiça				1				8b		1b
		Paio	1	1						1		
C	24	Chouriço	4	4					2	7		
		Enchedora	1							2		
		Mesa	1	1					1	1		
D	13	Chouriço de Vinho	1	7								
		Chouriço de Carne		1								
		Chourição	1	3								
		Salsichão Grosso										
E	11	Linguiça							5	1		
		Enchedora	3	1	1							
Número Total de Ocorrências			12	27	1	1	2	0	8	28	1	1

a,b – Estirpes com a mesma letra presentes em diferentes grupos.

4.4. Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de *Lactobacillus plantarum* e a sua relação com a resistência à Tetraciclina

Combinando os diferentes resultados da caracterização dos tipos de perfil PCR *Fingerprinting* dos isolados em estudo, das características de expressão fenotípica de suscetibilidade a antibióticos e da presença de genes de resistência *tets* tornou-se possível fazer uma diferenciação mais precisa do grupo de isolados estudados. Na Figura 6 pode ser observado o dendrograma obtido da conjugação dos dados genéticos com os fenotípicos dos isolados em estudo.

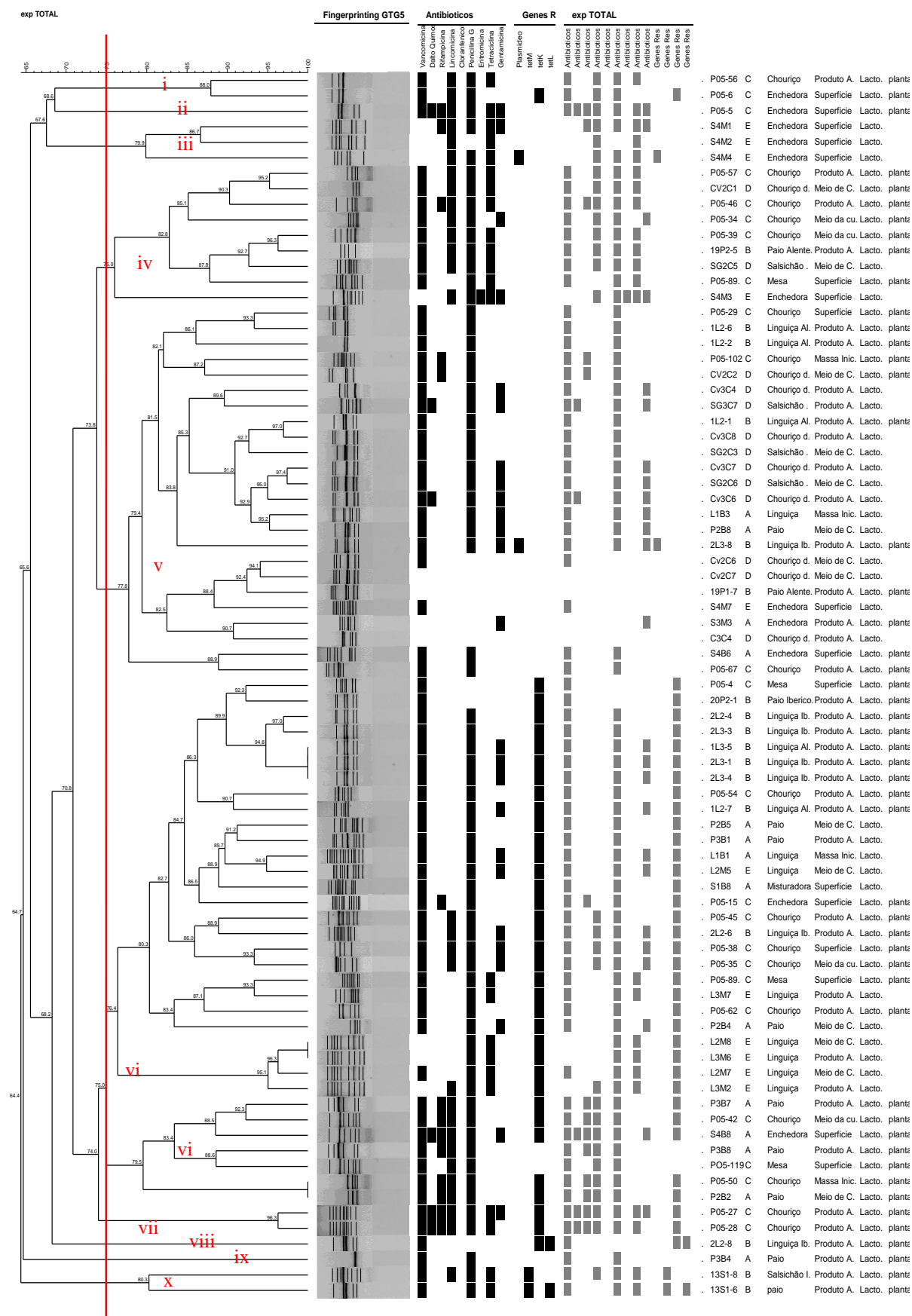
Tal como anteriormente, um *cut off point* de 75% de similaridade foi definido na Figura 6, levando à formação de 10 subgrupos de estirpes.

Após esta delimitação vários aspetos podem ser observados: a) o número de estirpes por grupo varia entre 1 e 34; b) a maioria das estirpes encontra-se inserida em um dos 3 grandes grupos, nomeadamente, o v, vi e vii; c) o grupo vi contém 36 isolados com pelo menos 75% de similaridade entre si; d) as estirpes da indústria A são aquelas que menor tendência tiveram para se agruparem, visto existir com frequência similaridade entre isolados com essa origem e com origem nas outras 4 indústrias; e) estirpes com origem no mesmo produto ou superfície tendem a aparecer juntos, demonstrando alto níveis de similaridade entre si variando entre os 78 e os 100%; f) poucas estirpes não se enquadraram num dos grupos principais de similaridade verificados e; g) os isolados pertencentes ao grupo referido no anterior dendrograma (Figura 5) por terem uma similaridade de 66,7% em relação ao restante grupo, permaneceram semelhantes entre si e, apesar de continuarem um pouco distantes percentualmente do grupo, houve uma gradual aproximação quando feita a comparação.

Estirpes com pelo menos 90 % de similaridade poderão ser consideradas clones, assim 16 relações de igualdade foram observadas. Destas, apenas 4 relações permaneceram iguais desde a primeira avaliação apenas com os dados de caracterização do perfil genético. Deste modo os isolados seguintes demonstraram ter igualdade: i) L2M8=L3M6=L2M7, todos da indústria E; ii) P05-27=P05-28, os dois da indústria iii) Cv2C6=Cv2C7, também os dois da indústria D e; iv) 2L2-4=2L3-3=1L3-5=2L3-1=2L3-4).

Após a conjugação de todos os dados relativos à expressão fenotípica e ao material genético associado à resistência a tetraciclina obteve-se uma diversidade no grupo de estirpes da espécie *Lactobacillus plantarum*, relativamente baixa traduzida por um índice de Simpsom's de 28,5%.

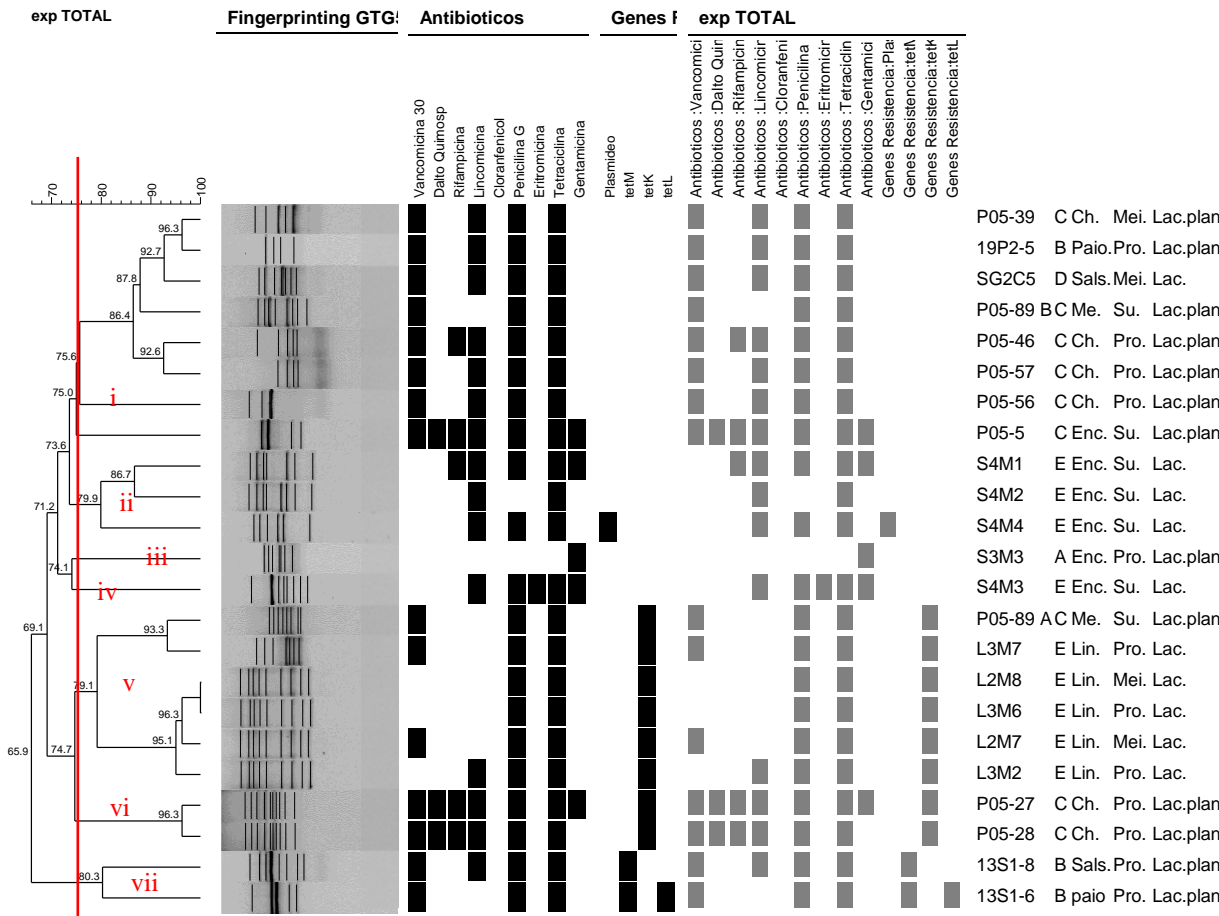
Figura 7 - Dendrograma da análise do perfil genético conjugado com a análise fenotípica das estirpes *L. plantarum*.



4.4.1. Similaridade entre estirpes fenotipicamente resistentes à Tetraciclina

Para uma melhor compreensão dos dados recolhidos a partir dos resultados obtidos especificamente para as estirpes que demonstraram ter resistência fenotípica à tetraciclina, foi construído o dendrograma da Figura 7, juntado, deste modo, todos os dados genéticos às estirpes resistentes.

Figura 8 - Dendrograma da análise dos dados genéticos em conjunto com a análise fenotípica das estirpes *L. plantarum* que demonstraram resistência à tetraciclina.



Ao observar o dendrograma da Figura 7, constatou-se que houve formação de 8 grupos com 75% de similaridade em relação à combinação de dados genéticos de *Fingerprinting*, fenotípicos de resistência e de presença de genes de resistência à tetraciclina dos 23 isolados resistentes.

Dos grupos formados é o i que maior número de estirpes contém (n=8), neste constatamos a presença de estirpes provenientes de produtos e de superfícies com 87,6% de semelhança entre si. Observa-se também que 9 isolados, dos 11 pertencentes à indústria E estão inseridos

no grupo com resistência à tetraciclina, e na maioria a origem de recolha é da linguiça, mas também da superfície da enchedora.

O índice de diversidade para este grupo de isolados foi de 18,97%, demonstrando existir pouca variabilidade entre o conjunto de estirpes resistentes à tetraciclina.

5. Discussão

Neste trabalho foi estudada uma coleção de *Lactobacillus plantarum*, isolados a partir de amostras de vários produtos de salsicharia tradicional e de superfícies de trabalho, recolhidas em cinco indústrias localizadas no Alentejo. A escolha deste grupo de microrganismos foi feita por ser uma das espécies bacterianas mais encontradas em produtos cárneos fermentados, quer naturalmente quer por adição como culturas *starter* (Silva, 2003). Esta utilização deve-se ao benefício que aportam as estirpes de *L. plantarum* como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados. No seu perfil incluem-se características como: a sua proveniência natural, capacidade protetora contra agentes patogénicos e os que deterioram o produto e apetência tecnológica, nomeadamente capacidade de melhorar as características sensoriais e sanitárias de produtos cárneos fermentados (Martins, Santarosa & Freitas, 2003; Campagnol *et al.*, 2007; Coelho, Benevenuto, Benevenuto Júnior & Carlos, 2010).

Do grupo analisado, 80 isolados pertencem ao género *Lactobacillus*, 79 à espécie *L. plantarum* e 1 à espécie *L. reuteri*, o que levou à eliminação deste da coleção em estudo. A metodologia de PCR Fingerprinting foi fundamental para permitir a caracterização genética dos isolados, pois através da elaboração de dendrogramas foi determinada a semelhança entre isolados. Segundo variáveis escolhidas, os dados foram interligados de forma hierárquica, dispondo os isolados pelo grau de semelhança entre eles, assim, quanto menor a distância entre eles, maior a semelhança genética existente (Neto, 2004). Deste modo fez-se a confirmação de que os isolados, sem espécie determinada até à data, pertenciam à espécie *L. plantarum* por apresentarem uma elevada similaridade com estirpes pertencentes à espécie *L. plantarum*. O grupo xv (Figura 5) teve uma percentagem de similaridade abaixo dos 80% o que tornaria duvidosa a sua identificação à espécie *L. plantarum*, contudo, por terem um nível de similaridade razoável (66,7%) decidiu-se que seriam mantidos na coleção, até porque quando foram comparados com outras espécies de *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. alimentarius* e *L. casei*) apresentaram maior similaridade com os isolados *L. plantarum* e com o controlo positivo utilizado (*L. plantarum* CECT 220 CSI) do que com estirpes de outras espécies de *Lactobacillus*.

Os métodos de identificação genéticos (PCR) são de extrema importância, pois de acordo com Pennachia *et al.* (2004) a crescente dificuldade na identificação por meios bioquímicos de bactérias *Lactobacillus*, exige a utilização de metodologias de base genética simples e rápidas, permitindo com maior exatidão e sensibilidade identificar e selecionar isolados corretamente para futura utilização tecnológica, como culturas *starter*. A adição destes microrganismos tem como objetivo gerar um processo fermentativo mais controlado, com produtos finais uniformes, seguros e confiáveis (Elias *et al.*, 2005). As culturas *starter*, além das

características já referidas, têm de possuir outro tipo de qualidades para poderem ser utilizadas a nível industrial de forma segura, uma delas é a de apresentarem um perfil de antibioresistências adequado de modo a impedir o aumento da ocorrência de resistências a antibióticos utilizados no tratamento de doenças infecciosas no consumidor (Macedo, 2005; Baptista, 2013).

Nos testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) os isolados estudados apresentaram respostas diferentes consoante o antibiótico: 86,25% das estipes apresentaram resistência à vancomicina (30 µg); 87,5% à penicilina G (10 UI); 1,25% à eritromicina; 28,75% à tetraciclina (30 µg); 31,25% à gentamicina (10 µg); 7,5% à Daltopristina/ Quimospristina (15 µg); 17,5% à rifampicina (5 µg); 37,5% à lincomicina (15 µg) e nenhuma ao cloranfenicol (30 µg). Assim a coleção estudada demonstrou de forma geral suscetibilidade à eritromicina, tetraciclina, daltopristina/ quimospristina, gentamicina, rifampicina, lincomicina e ao cloranfenicol e resistência a vancomicina e penicilina G. Egervärn (2012) reportou a existência de suscetibilidade a penicilinas, a antibióticos inibidores de síntese proteica, como a tetraciclina e a eritromicina, com exceção dos aminoglicosídeos, como a gentamicina em *Lactobacillus*. Outros autores reportaram suscetibilidade também à daltopristina/quimospristina e lincomicina nestes microrganismos (Charteris *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Bernardeau *et al.*, 2008). Apenas a resistência à penicilina e à gentamicina apresentada pela maioria dos isolados estudados foi contrária ao exposto acima. Este fato pode dever-se provavelmente a: i) pressão causada pela elevada utilização de penicilina G ao nível da produção de suínos, o que poderá ter levado à ocorrência de seleção genética de estirpes resistentes (com mutações genéticas casuais que possibilitaram a aquisição de resistência) a este antibiótico e por esse motivo existir uma elevada percentagem de isolados resistentes que provavelmente estarão a transmitir genes de resistência entre eles (Baptista, 2013); e ii) no caso da gentamicina a baixa resistência dos isolados indicia que podem ter ocorrido problemas de nível técnico, relacionados com o método de avaliação de sensibilidade a antibióticos utilizado, uma vez que a resistência a este composto é considerada intrínseca nos *Lactobacillus* (Bernardeau *et al.*, 2008). De acordo com Ammor *et al.* (2007a) existem alguns fatores na metodologia de avaliação de sensibilidades a antibióticos que podem alterar os resultados obtidos, como por exemplo, o meio de cultura, as variações no teor de catiões ou a concentração dos compostos críticos no meio, tais como a timina ou ácido fólico que podem influenciar os resultados obtidos, assim como a concentração do inóculo, a temperatura, o período de incubação, entre outros fatores. Além disso sabe-se também que alguns isolados de BAL podem multiplicar-se relativamente mal no meio de Mueller-Hinton, sendo este o utilizado no teste de sensibilidade a antibióticos por difusão de disco (método utilizado neste

estudo). Ambas as justificações (i e ii) podem ser aplicadas para alguns dos poucos isolados que demonstraram uma resposta diferente da esperada ao grupo de antibióticos em análise e onde se descreve a existência de resistências intrínsecas para esta espécie. A resistência quer à vancomicina quer à gentamicina, é considerada intrínseca em *Lactobacillus* (Salminen *et al.*, 2004).

Vários estudos evidenciaram a existência de resistência de *L. plantarum* a antibióticos como a vancomicina, penicilina G, gentamicina, tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol (Bernardeau, 2008; Herrero, Mayo, Ganzales & Suarez, 1996). Também Dhillon, Ghosh & Ganguli (2007), reportaram a existência de suscetibilidade à eritromicina, ao cloranfenicol e à tetraciclina em *L. plantarum* isolados de molhos verdes indianos (do inglês, Indian Green Sauces).

No caso da tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina a diferença entre os resultados descrita acima, poderá dever-se à existência ou não de genes de resistência transmissíveis. Esta variabilidade demonstra a influência da existência ou não dos genes de resistência à tetraciclina. Nos resultados obtidos neste trabalho, isso também se verificou, pois algumas estirpes demonstram ter suscetibilidade à tetraciclina, ao cloranfenicol ou à eritromicina, enquanto outras demonstraram resistência aos mesmos. Quando ocorreu resistência em qualquer um dos 3 antibióticos estes genes estariam provavelmente inseridos no material genético dessas estirpes, visto que a troca destes entre bactérias é a causa do aparecimento de resistências (Teuber *et al.*, 1999; Danielsen & Wind, 2003). Já quando ocorreu a suscetibilidade, os genes não deveriam estar presentes. Deste modo consoante a existência ou ausência destes elementos genéticos nas estirpes estudadas a resposta aos 3 antibióticos irá variar, de estirpe para estirpe.

Dos isolados testados apenas 3 apresentaram suscetibilidade a todos os antibióticos avaliados (19P1-7, S4M7 e C3C4), considerando-se os restantes isolados potenciais perigos quando utilizados na indústria alimentar, pois poderão transmitir essas resistências a outros microrganismos da microbiota fermentativa e gastrointestinal (Barton & Hart, 2001).

Já os isolados S4M7, P05-4, 20P2-1 e Cv2C6 demonstram resistência apenas a antibióticos que estão associados a uma resistência intrínseca por parte deste tipo de bactérias, tornando-os bons candidatos para uma análise mais detalhada.

Analisando os resultados obtidos com o agrupamento dos isolados por indústrias, constatou-se a ocorrência de vários tópicos de discussão. No caso da vancomicina a resistência existente em *Lactobacillus* é de origem intrínseca (Salminen *et al.*, 2004) o que contraria os resultados obtidos para a indústria E. Deste modo é provável que, apesar do teste ter decorrido sempre de forma controlada e padronizada, ocorreu algum erro técnico durante o processamento destes

isolados, tornando-se necessário fazer de futuro uma nova avaliação á sensibilidade destes isolados à vancomicina, para confirmar ou corrigir os dados obtidos. No caso da lincomicina a elevada incidência de isolados resistentes na indústria C pode evidenciar uma má utilização do antibiótico ao nível da exploração pecuária fornecedora de suínos e consequente entrada na indústria fabril de matéria-prima carne contaminada com isolados resistentes. A má utilização do antibiótico poderá ter levado à seleção de estirpes resistentes, explicando a elevada percentagem de isolados observados. Também a existência de pressão e stress seletivo na indústria com a utilização de desinfetantes poderá ter efeito na seleção de isolados que por apresentarem resistência serão os mais persistentes (Baptista, 2013). Tais fatos podem ser também utilizados para explicar a incidência elevada de isolados resistentes à tetraciclina na indústria E. Uma má utilização da tetraciclina, poderá levar ao desenvolvimento de estirpes resistentes e consequentemente à transmissão de genes que conferem resistência entre as bactérias através de veículos de transmissão como plasmídeos, tornando-se um motivo de preocupação (Ammor, *et al.*, 2008). A competitividade existente na microbiota do ambiente fabril da indústria favorece também a troca destes elementos genéticos móveis portadores de genes de resistência. Isto é demonstrado pela descrição da possibilidade dessa troca entre espécies gram-negativas como *E. coli* e *Pseudomonas* e gram-positivas como *Enterococcus* e *Staphylococcus* presentes nesta microbiota fabril (Origionni *et al.*, 1996).

A informação sobre o perfil de resposta a antibióticos, em estirpes utilizadas como culturas *starter* nos produtos cárneos fermentados, é de extrema importância para o controlo desta propagação. Na atualidade, além de uma análise fenotípica à resistência a antibióticos é feita também uma análise genética para complementar os dados, pesquisando-se normalmente a presença de determinantes que confirmam a resistência aos antibióticos (Ammor, *et al.*, 2007a). Sendo a tetraciclina um dos antibióticos que tem maior utilização tanto em humanos como em animais, é importante determinar a incidência de resistência e de elementos transmissíveis de resistência a este antibiótico em estirpes utilizadas como culturas *starter*, como por exemplo os *L. plantarum* (Clermont *et al.*, 1997; Thumu & Halami, 2012).

Existem vários determinantes de resistência à tetraciclina, sendo mais frequentemente encontrados, genes que codificam Proteínas de Proteção Ribossomal (RPP) e Proteínas de Bomba de Efluxo. Estes são importantes por estarem geralmente associados a elementos genéticos móveis que facilmente são transmitidos entre bactérias (Egervärn, 2009).

Neste trabalho a pesquisa de genes inespecíficos codificantes de RPP, resultou numa frequência bastante reduzida, pois apenas 2 isolados tiveram amplificação para este gene. Posteriormente foi feita a identificação específica do gene de proteção ribossomal *tet(M)* destes isolados. Em nenhum dos casos tal ocorreu, demonstrando que o gene RPP amplificado

não será a *tet(M)* mas sim outras *tets* específicas associadas a este gene inespecífico, nomeadamente as *tet(O)*, *tet(Q)* ou *tet(S)* (Clermont *et al.*, 1997, citado por Gevers, *et al.*, 2003). Assim a resistência observada no isolado S4M4, negativo para *tet(M)* mas positivo para o gene RPP, estará ligado à presença de um dos genes *tet(O)*, *tet(Q)* ou *tet(S)* referidos anteriormente. No caso da estirpe 2L3-8, a suscetibilidade demonstrada à tetraciclina poderá ter ocorrido pela não expressão do gene RPP contido no seu material genético, pois esta estirpe pode nunca ter estado sob ação do efeito da tetraciclina no ambiente fabril onde reside o que poderá influenciar na capacidade da bactéria reagir geneticamente ao antibiótico existindo fatores que poderão interferir e mediar a expressão da resistência, como a dificuldade na transmissão do sinal químico necessário para desencadear a síntese no gene que codifica a proteína de resistência (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2012).

A pesquisa de genes codificantes de proteínas de bomba de efluxo, fez-se para os genes *tet(K)* e *tet(L)*. Observou-se uma grande frequência de estirpes com a *tet(K)*, nomeadamente, 36 da coleção trabalhada. Destes 77,77% apresentaram suscetibilidade, podendo indicar que por algum motivo a expressão do gene não se manifestou na presença do antibiótico. Apesar de o gene estar presente, não significa que ele se manifeste, pois vários fatores, como as condições do meio (pH, concentração de nutrientes, luz), os mecanismos de síntese da proteína codificada pelo gene ou os sinais bioquímicos que permitem à célula compreender quando sintetizar o gene de resistência, podem impedir a manifestação do mesmo (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2012).

A pesquisa do gene *tet(L)*, demonstrou também resultados baixos existindo apenas 2,53% (2 isolados) de frequência no grupo total de estirpes. Neste caso apenas 1 deles apresentou resistência (13S1-6), significando que também não ocorreu a expressão do gene no isolado susceptível, tal como anteriormente descrito para a estirpe 2L3-8, fatores físicos, químicos e bioquímicos poderão ter originado esta falha na expressão do gene existente no genoma.

Dos isolados resistentes, 80% tiveram resultados negativos para a deteção dos genes de resistência deste estudo. Nestes casos a resistência poderá ser explicada pela presença de outros genes de resistência à tetraciclina que não foram pesquisados como *tet(W)*, *tet(S)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(36)*; *tet(Z)*, *tet(O/W/32/O/W/O)* e *tet(W/S)* (Lahtinen *et al.*, 2009). De todos os isolados em análise, 31 (39,24%) não apresentaram qualquer dos elementos em estudo, isto é, todos foram sensíveis à tetraciclina e estavam isentos dos genes de resistência à tetraciclina pesquisados neste estudo.

Considerando o agrupamento da indústria constatou-se que a indústria D não possuiu qualquer estirpe com genes de resistência à tetraciclina estudados, mas duas estirpes apresentaram resistência a este antibiótico. Como tal estas estirpes terão associados fatores já

descritos, tais como, outros genes de resistência ou mutações, para lhes conferir a resistência constatada. Por outro lado, proporcionalmente foi a indústria B que maior número de isolados portadores de genes de resistência teve (70,5%), seguido da indústria E (63,6%) que apresentou resultados positivos para 7 dos seus 11 isolados.

Do grupo de estirpes destacaram-se a Cv2C6 e a S4M7, por a nível fenotípico, como anteriormente referido, apenas apresentarem resistências intrínsecas e por não apresentarem nenhum dos elementos de resistência à tetraciclina pesquisados. Deste modo estes isolados poderiam ser totalmente caracterizados, quer geneticamente, como fenotipicamente, nomeadamente, a sua capacidade protetora de géneros alimentares e a sua capacidade tecnologia (proteolítica, lipolítica) para determinar com total certeza a sua aplicação favorável como culturas *starter*.

6. Conclusões

As 79 estirpes analisadas neste trabalho foram identificadas, utilizando metodologias de PCR para identificação de gênero e PCR fingerprinting, como *Lactobacillus plantarum*, tendo-se excluído aquelas que não demonstraram pertencer a este gênero e espécie de bactérias ácido lácticas (5 isolados).

Os valores de resistência aos antibióticos demonstrados foram na maioria baixos, havendo estirpes com níveis de resistência moderados à tetraciclina (30 µg), 28,75%; à gentamicina (10 µg), 31,25%; e à lincomicina (15 µg), 37,5%. Para a penicilina os isolados em estudo apresentaram uma elevada resistência, 87,5%. Este aspecto no caso da penicilina poderá eventualmente suscitar algum interesse ligado à mediação da resistência a este antibiótico nesta população e na evolução biológica desta bactéria.

No que diz respeito à presença de elementos de resistência à tetraciclina, o número de estirpes com os genes codificantes de proteínas de proteção ribossomal pesquisados, foi bastante reduzido, havendo a necessidade de se confirmar a inexistência de outros genes desta classe. Já a presença de genes de codificação de proteínas de bomba de efluxo foi observada principalmente para o gene *tet(K)*, com uma frequência de 45,56% enquanto a *tet(L)* apenas apresentou 2,53%, no grupo de estirpes em análise. Nem todos os isolados que continham genes de resistência demonstraram resistência à tetraciclina, pois a existência do gene na informação genética bacteriana não é o suficiente para a sua manifestação fenotípica. Por outro lado observou-se que nem todas as estirpes resistentes à tetraciclina possuíam os genes de resistência pesquisados o que poderá indicar a presença de outros fatores responsáveis por essa mesma resistência. Para todos estes dados será necessário uma avaliação posterior de forma a estudar genética e fenotipicamente estas estirpes garantindo um conhecimento mais pormenorizado.

Do grupo de estirpes, 2 destacaram-se, Cv2C6 e S4M7, pelas características apresentadas às avaliações genéticas e fenotípicas realizadas neste trabalho, pois apenas demonstraram resistência a antibióticos associados a mecanismos intrínsecos e não evidenciaram qualquer dos genes de resistência analisados. Deste modo estas duas estirpes possuem potencial para uma melhor análise das suas propriedades fisiológicas, metabólicas e tecnológicas determinando se são ideais ou não para utilização como culturas *starter* em produtos cárneos fermentados, como os enchidos. Por outro lado algumas estirpes demonstraram suscetibilidade para os antibióticos analisados e não possuíam os genes de resistência procurados, podendo assim ser considerados aptos para serem utilizados como *starter* após uma melhor caracterização dos mesmos.

7. Bibliografia

- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M. & Jensen, L.B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, 37, 127-137.
- Ahn, C., Collins-Thompson, D., Duncan, C., Stiles, M.E. (1992). Mobilization and location of the genetic determinant of Chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* caTC2R. *Plasmid* 27, 169–176.
- Almeida, I. F. M. (2009). Caracterização Preliminar do Microbiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras. Faculdade de Medicina Veterinária –Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal
- Ammor, M.S. & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat Science*, 76 (1), 138-146.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B. & Mayo, B. (2007a). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Ammor, M.S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagorec, M., van Hoek, A H.A.M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Mayo, B. & Margolles, A. (2007b). Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried *tet(L)* and chromosomally located transposon-associated *tet(M)*, coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Applied and environmental microbiology*, 74, 1394-1401.
- Ammor, M.S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagorec, M., van Hoek, A.H.A.M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Mayo, B. & Margolles, A. (2008). Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried *tet(L)* and chromosomally located transposon-associated *tet(M)*, coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1394–1401.
- Andrés, A., Barat, J.M., Grau, R. & Fito, P. (2007). Principles of drying and smoking in Toldrá, F. (Eds). Handbook of fermented meat and poultry. (pp. 37-50). Blackwell Publishing Professional. Oxford,UK.
- Anónimo. (2009). *Lactobacillus plantarum*. University of Ottawa IGEM.
- Arnau, J., Serra, X., Comaposada, J., Gou, P. & Garriga, M. (2007). Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*, 77(1), 81-89.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen & A. von Wright (Eds). Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. (3rd ed.). (pp.1-72). Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Barton, M.D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, 13, 1-22.
- Barton, M.D. & Hart, W.S. (2001). Public health risks: antibiotic resistance- review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 14, 414-422.

Baptista, M.G.F.M. (2013). *Mecanismos de resistência a antibióticos*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Lisboa, Portugal.

Batt, C.A. (1999). *Lactobacillus*: Introduction. In R.K, Robison, C.A. Batt & P.D., Pater (Eds.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 1134-1135). Academic Press. San Diego, USA.

Bedia, M., Méndez, L., Bañón, S. (2011). Evaluation of different starter cultures (Staphylococci plus Lactic Acid Bacteria) in semi-ripened Salami stuffed in Swine gut. *Meat Science*, 87, 381-386.

Bernardeau M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S. & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278–285.

Bismuth, R., Zilhao, R., Sakamoto, H., Guesdon, J.L. & Courvalin, P. (1990). Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 1611-1614.

Bronzwaer, S.L., Cars, O., Buchholz, U., Molstad, S., Goettsch, W., Veldhuijzen, I.K., Kool, J.L., Sprenger, M.J. & Degener, J.E. (2002). A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Disease journal*, 8, 278–282.

Burdett, V. (1986). *Streptococcal* tetracycline resistance mediated at the level of protein synthesis. *Journal of Bacteriology*, 165, 564-569.

Campagnol, P.C.B, Fries, L.L.M., Terra, N.N., Santos, B.A. & Furtado, A.S. (2007). Salame elaborado com *Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de cultura de plasma de suíno. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 27, 883-889.

Campbell-Platt, G. (1999). Fermented Foods: Origins and Applications. In R.K, Robison, C.A. Batt & P.D., Pater (Eds.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 736-738). Academic Press. San Diego, USA.

Caplice, E., Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.

Carbonera, N. & Espirito Santo, M.L.P. (2010). Atividade do *Lactobacillus plantarum* na preservação de anchoita (*Engraulis anchoita*) fermentada. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 69, 201-207.

Carr, F.J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (4), 281-370.

Carvalho, L.M.C.P.Q. (2010). *Identificação e Caracterização de Isolados de Staphylococcus: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados*. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal.

Cashel, M., & Rudd, K. E. (1987). The stringent response. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (Eds.), *Escherichia*

E. coli and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. (pp. 1410-1438). American Society for Microbiology. Washington, D.C, USA.

Cataloluk, O. & Gogebakan, B. (2004). Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 7–12.

Cerqueira, C. (2000). Matança do porco, festa da matança e mudanças sociais na Serra do Barroso (Trás-os-Montes). Instituto de Ciências Sociais -Universidade do Minho.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 61, 1636 –1643.

CA-SFM. (2010). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Recommandations 2010, January edition, 49. *Société Française de Microbiologie*. Paris, France.

Chisti, Y. (1999). Fermentation (Industrial): Basic Considerations. In R.K, Robison, C.A. Batt & P.D., Pater (Eds.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 663-673). Academic Press. San Diego, USA.

Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232–260.

Clermont, D., Chesneau, O., Cespédès, G. & Horaud, T. (1997). New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of *tet(T)* isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *American Society for Microbiology*, 41, 112-116.

CLSI. (2008). Performance standards dos antimicrobial disk and dilution susceptibility testes for bacteria isolated from animals. Approved Standard (3rd edition), CLSI document M31-A3, 116. Wayne, Pennsylvania, USA.

Coelho, M.S., Benevenuto, W.C.A.N., Benevenuto Júnior, A.A & Carlos, F.G. (2010). Desenvolvimento de embutido cárneo fermentado por microrganismos probióticos. III Semana de Ciência e Tecnologia. IFMG. Bambuí, Brasil.

Cogan, T. M. (1999). Starter cultures: Cultures employed in chesse-making. In R.K, Robison, C.A. Batt & P.D., Pater (Eds.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 2100-2108). Academic Press. San Diego, USA.

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 85, 193–204.

Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43, 164-169.

Danielsen, M. (2002). Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Academic Press*, 48, 98-103.

- Danielsen, M. & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1–11.
- DANMAP (2006). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. DVL, Denmark.
- Davies, J.E. (1993). Grandeur et décadence des antibiotiques. *La Recherche*, 24, 1354–1361.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264, 375–382.
- Davies, J. (1997). Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds.), *Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*, vol. 207, (pp. 15–27). Ciba Foundation Symposium. Wiley, Chichester, UK.
- Delgado, S., Flórez, A.B. & Mayo, B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Current Microbiology*, 50, 202–207.
- Dibner, J.J. & Richards, J.D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science*, 84, 634–643.
- Dhillon, S., Ghosh, M. & Ganguli, A. (2007). Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* Ch1 isolates from Indian green sausage. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 2, 105–110.
- Dzidic, S., Suskovic, J. & Kos, B., (2008). Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology Biotechnology*. 46(11), 11–21.
- Egervärn, M. (2009). Antibiotic Resistance in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences: Department of Microbiology. Uppsala, Sweden.
- Elias, M., Fraqueza, M.J. & Barreto, A. (2005). Typology of the traditional sausage production from Alentejo. *Revista Portuguesa de Zootécnica*, n.1.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T. & Suihko, M.L. (2001). Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat Science*, 58, 111–116.
- Essid, I., Medini, M. & Hassouna, M. (2008). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*, 81, 203–208.
- Fernandez, P. (2006). Antibacterial discovery and development-the failure of success. *Nature Biotechnology*, 24, 1497–1503.
- Fitzgerald, G.F. & Gasson, M.J. (1988). In vivo gene transfer systems and transposons. *Biochimie*, 70, 489–502.

- Flórez, A.B., Delgado, S. & Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 51–58.
- Fraqueza, M.J. (2003). La Charcuterie Traditionnelle Portugaises. Les Salaisons Portugaise. *Compte-rendu du 7ème rencontres agroalimentaires du grand rodez “Les Salaisons du sud de L’Europe”*. Comunicação Oral, 21 e 22 de Outubro. Rodez., France.
- Fraqueza, M.J., Patarata, L. (2006). *Recomendações Práticas de Higiene para enchidos tradicionais fermentados e secos. Guia Prático de aulas*. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, Portugal.
- Fons, M., Hege, T., Ladire, M., Raibaud, P., Ducluzeau, R. & Maguin, E. (1997). Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. *Plasmid* 37, 199–203.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. & McSweeney, P.L.H. (2000). Fundamentals of cheese science. *Aspen Publishers, Inc.*, 5, 54-97. New York, USA.
- Garcia, F.T., Gagleazzi, U.A & Sobral, P.J.A. (2000). Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. *Brazilian Journal of Food Technology*, 3, 151-158.
- Garg, S. F. & Sandhir. (1999). Genetic of Microorganisms: Bacteria. In R.K, Robison, C.A. Batt & P.D., Pater (Eds.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 929-939). Academic Press. San Diego, USA.
- Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., & Swings, J. (2003). Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applies and Environmental Microbiology*, 69, 1270-1275.
- Hammes, W., Bantleon, A. & Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 165-174.
- Hassan A.N & Frank J.F. (2001). Starter cultures and their use. In E.H. Marth & J.L. Steele (Eds.), *Applied Dairy Microbiology*. (pp. 151-206). Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Haully, M.C.O., Nogueira, R.B. & Oliveira, A.S. (2001). Influência na NaCl e do NaNO₂ sobre a fermentação láctica desenvolvida pelo *Lactobacillus curvatus* em meio MRS. *Ciências Exatas e Tecnologia*, 22, 37-41.
- Hayes, J.D. & Wolf, C.R. (1990). Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochemical Journal*, 272, 281-295.
- Herrero, M., Mayo, B., Ganzales, B. & Suarez, J.E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 565–570.
- Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., & Franz, C.M. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 730–739.

Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465-2466.

Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M. & Swings, J. (2004). Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1555–1562.

Huys, G., D'Haene, K. & Swings, J. (2006). Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1550–1551.

INFARMED (2007). *Relatório do departamento de medicamentos veterinários – O medicamento veterinário farmacológico. Abordagem analítica*. Lisboa: INFARMED.

Jacoby, G.A. & Archer, G.L. (1991). New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *The New England Journal of Medicine*, 324 (9), 601-612.

Jay, M.J., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). *Modern Microbiology in Food*. (6th ed.). Springer Science & Business Media Inc. New York, USA.

Lahtinen, S.J., Boyle, R.J., Margolles, A., Frías, R. & Gueimonde, M.(2009). “Safety assessment of probiotics. In D. Charalampopou- los & R.A. Rastall (eds), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (pp.1193–1225). Springer-Verlag. Berlin.

Levy, S.B. (1988). Tetracycline resistance determinants are widespread. *American Society for Microbiology*, 54, 418-421.

Levy, S.B. & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Natural Medicine Review*, 10, 122–S129.

Lin, C.F., Fung, Z.F., Wu, C.L. & Chung, T.C. (1996). Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (cat-TC) from *Lactobacillus reuteri* G4. *Plasmid*, 36, 116–124.

Lücke, F.K. (1998). Fermented sausages. In B.J.B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods*. (pp. 441-483). Blackie Academic and Professional. London, UK.

Lücke, F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 56, 105-115.

Macedo, R.E.F. (2005). *Utilização de culturas lácticas próbióticas no processamento de produto cárneo fermentado*. Pós-graduação de Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal do Panamá. Curitiba, Brasil.

Martins, E.C., Santarosa, P.R. & Freitas, F.Z. (2003). Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 23(2), 195-199.

Mathur, S. & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295.

McMurry, L., Petrucci, R.E. & Levy, S.B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 77, 3974-3977.

Miller, R.V. (1998). Bacterial genes swapping in nature. *Scientific American*, 278(1), 47-51.

Moellering, R.C. (1990). Principles of anti-infective therapy. In G.L. Mandell, R.G. Douglas, & J.E. Bennett (Eds.), *Principles and practice of infectious disease*. (pp. 206-218). Churchill Livingstone Inc. New York, USA.

Montel, M. C. (1999). Fermented food: Fermented meat products. In R.K. Robison, C.A. Batt & P.D., Pater (Eds.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 744-752). Academic Press. San Diego, USA.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S. & Pfaller, M.A. (2012). *Medical Microbiology* (7th Ed.). Saunders. EUA.

Neto, J.M.M. (2004). Estatística multivariada: Uma visão didática-metodológica. Consultado a 20 de Setembro, disponível em http://criticanarede.com/cien_estatistica.html.

Nicolaou, K.C., Montagnon, T. (2008). *Molecules that Changed the World*, 13. Wiley-VCH: Weinheim.

Norma Portuguesa NP 588:2008. (2008). *Carnes e produtos cárneos: Definição e classificação*. Instituto Português da Qualidade. Portugal.

Normark, B.H., Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252, 91–106.

Novais, C., Coque, T.M., Costa, M.J., Sousa, J.C., Baquero, F. & Peixe, L.V. (2005). High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1139-1143.

O'Brien, T.F., & Members of Task Force 2. (1987). Resistance of bacteria to antibacterial agents: report of task force 2. *Rev. Infect. Dis*, 9, S244-S260.

Ockerman, H.W., Basu, L. (2007). Production and consumption of fermented meat products. In Toldrá, F, *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 9-15). Blackwell Publishing. Iowa, USA.

Oggioni, M.R., Dowson, C.G., Smith, J.M., Provvedi, R. & Pozzi, G. (1996). The Tetracycline resistance gene *tet(M)* exhibits mosaic structure. *Academic Press*, 35, 156-163.

Okeke, I. N., Lamikanra, A. & Edelman, R. (1999). Socioeconomic and Behavioral Factors Leading to Acquires Bacterial Resistance to Antibiotics in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases*, 5(1).

Oliveria, S. (n.d.). Bio manual: Expressão dos genes. Acedido a Set. 29, de 2013, disponível em: <http://home.dbio.uevora.pt/~oliveira/Bio/Manual/43.htm>.

Ordoñez, J.A., Hoz, L. (2007). Mediterranean Products In Toldrá, F. *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 333- 348). Blackwell Publishing. Iowa, USA

Patarata, L., Cardoso, P., Bessa, C., Silva, J. A., Martins, C., (1998). The role os phosphates on sensory attributes of a traditional dry-cured sausage - linguiça. 44th International Congress of Meat Science andTechnology, Barcelona. II: 848-849.

Pato, M.V.V. (1989). *Susceptibilidade aos Antibióticos* – Manual de Laboratório. Portugal: bioMérieux Portuguesa e INSA. Lisboa, Portugal.

Pennachia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe,O., Mauriello, G. & Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67, 309- 317.

Petaja-Kanninem, E., Puolanne, E. (2007). Principles of meat fermentation. In Toldra, F, *Handbook of fermented meat and poultry*, (pp. 31-36). Blackwell Publishing. Iowa, USA.

Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G. & Ellerbroek, L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal Food Microbiology*, 88(2-3), 311-314.

Pereira-Maia, E.C., Silva, P.P. & Almeida, W.B. (2010). Tetraciclina e gliciclinas: Uma revisão geral. *Química Nova*, 33(3), 700-706.

Perreten, V., Kolloffel, B. & Teuber, M. (1997). Conjugal transfer of the Tn916-like transposon TnFO1 from *Enterococcus faecalis* isolated from cheese to other Gram-positive bacteria. *System Applied Microbiology*, 20, 27–38.

Phillips, I. (2007). Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 101-107.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., Do Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. & Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human Health? A critical review. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), 28-52.

Piard, J-C., Le Loir, Y., Poquet, I. & Langella, P. (1999). Bactérias lácticas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 2 (8), 80-84.

Pinto, M.F., Ponsano, E.H.G. & Heinemann, R.J.B. (2001). Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos – uma revisão. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 35 (1-2), 109-116.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A. & Ower, R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8, 151-156.

Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J. & Torres, C. (2006). Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal Antimicrobail Agents*, 27(2), 131-137.

Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (Suppl. 1), 55S– 64S.

- Prandl, O., Fischer, A., Shmidhfer, T. & Sinell, H. (1994). Tecnologia e higiene dela carne. Acribia, Zaragoza, Espanha.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005). *Microbiology* (6th Ed). (pp. 510- 600) McGraw-Hill Companies Inc. London, UK.
- Price, J.F. & Schweigert, B.S. (1994). Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos, 581.
- Robert-Dernuet, S. (1995). Antibiotiques et antibiogrammes. Décarie Vigot, Paris.
- Roberts, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 195-203.
- Roça, R.O. (2009). Defumação da carne. *Universidade Católica do Rio Grande do Sul*.
- Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. (Eds.). (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (3rd ed.). Marcel Dekker. New York, USA.
- Salyers, A.A., Speer, B.S. & Shoemaker, N.B. (1990). New perspectives on tetracycline resistance. *Molecular Microbiology*, 4, 151-156.
- Salyers, A.A., Gupta, A. & Wang, Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiology*, 12, 412–416
- Sherley, M., Gordon, D.M., Collignon, P.J. (2003). Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae. *Plasmid*, 49, 79–85.
- Silva, M.V. (2003). Segurança alimentar: produtos cárneos tradicionais enchidos e produto curados. AESBUC/UCP. Porto, Lisboa.
- Smith, J.T. & Lewin, C.S. (1993). Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Veterinary Microbiology*, 35, 233-242.
- Sousa, M.C., Ribeiro, A.M.R. (1983). Chouriço de Carne Português: Tecnologia da produção e caracterização química, microbiológica e imunológica, *Industria Alimentar*, vol. 1, pp.14-23.
- Speer, B.S., Shoemaker, N.B. & Salyers, A.A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, Transfer and clinical significance. *American Society for Microbiology*, 387-399.
- Standiford, H.C. (1990). Tetracyclines and chloramphenicol,. In G.L. Mandell, R.G. Douglas, & J.E. Bennett (Eds.), *Principles and practice of infectious diseases*. (pp. 284-295) Churchill Livingstone, Inc. New York, USA.
- Tannock, G.W., Luchansky, J.B., Miller, L., Connell, H., Thode- Andersen, S., Mercer, A.A. & Klaenhammer, T.R. (1994). Molecular characterization of a plasmid-borne (pGT633) erythromycin resistance determinant (ermGT) from *Lactobacillus reuteri* 100-63. *Plasmid* 31, 60–71

Tavares, W. (2000). Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Artigo de revisão da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33 (3), 281-301.

Terra, N.N. & Brum, M.A.R. (1988). Carne e seus derivados: Técnicas de controlo de qualidade., 121. Nobel. São Paulo, Brazil.

Teuber, M., Meile, L. & Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 115–137.

Trieu-Cout, P. & Poyart, C. (1998). Visite guide au Coeur de l'arsenal bactérien. *La Recherche*, 314, 62-66.

Thumu, S.C.R.T. & Halami, P.M. (2012). Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian Origin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 541-551.

Torres, C., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. (2005). Antibiotic resistance phenotypes and mechanisms of resistance in lactic acid bacteria of oenological origin. *Eighth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, metabolism, and applications. FEMS, Egmond aan Zee, The Netherlands*.

Vasilopoulos, C., Ravyts, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., Leroy, F. (2008). Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (5), 1341-1353.

Velho, M.V., Fonseca, S. & Pinheiro R. (2013). Estratégias inovadoras para desenvolver alimentos mais saudáveis: Foodsme-hop technology book. Acedido a 22 de Setembro de 2013, disponível em: http://www.irta.cat/ca-ES/RIT/Noticies/Documents/2013/Llibre_foods_mehop/Tech_Book_PT.pdf.

Villedieu, A., Díaz-Torres, M.L., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D.A., Wilson, M., Mullany, P. (2003). Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 878–882.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. & Lupski, J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 25–40.

Wigley, R.C. (1999). Starter Cultures: Uses in Food Industry. In R.K, Robison, C.A. Batt & P.D., Pater (Eds.), *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 2084-2094). Academic Press. San Diego, USA.

Yu, J., Gao, W., Qing, M., Sun, Z., Wang, W., Liu, W., Pan L., Sun, T., Wang, H., Bai, N. & Zhang, H. (2012). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles in Sichuan, China. *Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 163-172.

Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J. & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28, 1033-1040.

Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and Bifidobacterium strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 211–217.